

THESIS

MUNICH

1966

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

FREISETZUNG VON SEROTONIN AUS

THROMBOZYTEN DURCH HARMALIN

Heribert Peter



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154017_0195

AUS DER KLINISCH-CHEMISCHEN ABTEILUNG DER
CHIRURGISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Vorstand: Professor Dr. Dr. E. Werle

FREISETZUNG VON SEROTONIN AUS THROMBOZYTEN
DURCH HARMALIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Heribert Peter
aus Chodau

München 1966

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv.-Doz, Dr. H. SCHIEVELBEIN
Mitberichterstatter:	Professor Dr. Dr. E. WERLE
Dekan:	Professor Dr. R. ZENKER

Tag der mündlichen Prüfung: 22. März 1966

I N H A L T

	Seite
A) Einleitung	7
B) Theoretischer Teil	8
I. 5-Hydroxytryptamin	8
1. Biosynthese und Abbau	8
2. Physiologische Verteilung	9
3. Wirkung von 5-HT	10
4. Krankheitsbilder mit Veränderungen des 5-HT-Stoffwechsels	10
II. Beeinflussung des Stoffwechsels biogener Amine	11
1. Monominoxidase	11
2. Liberatoren von biogenen Aminen	11
3. MAO-Hemmer	12
III. Harmalin	13
1. Vorkommen	13
2. Wirkung	13
3. Interferenz von Harmalin mit 5-HT-Liberatoren und MAO-Hemmern	13
C) Problemstellung	17
D) Methoden	18
I. Thrombozytengewinnung für in-vitro-Versuche	18
II. Thrombozytengewinnung für in-vivo-Versuche	18
III. Bestimmung von 5-HT in Thrombozyten	18
1. Colorimetrische Methode	18
2. Fluorimetrische Methode	19
IV. Bestimmung des Harmalins	22
V. Verzeichnis der eingesetzten Substanzen mit häufig gebrauchten Trivialnamen, Synonyma und Struktur- formeln	23

	Seite
E) Ergebnisse	25
I. Freisetzung von 5-HT aus Thrombozyten in vitro	25
1. Spontanfreisetzung	25
2. Der Einfluß der Harmalin-Konzentration	25
3. Der Einfluß der Temperatur	26
4. Der Einfluß der Wasserstoff-Ionen-Konzentration	27
5. Der Einfluß von N_2 - und O_2 -Atmosphäre	28
6. Der Einfluß verschiedener MAO-Hemmer auf die 5-HT-Freisetzung durch Harmalin	28
II. Hemmung der Aufnahme von 5-HT in Thrombozyten durch Harmalin in vitro	30
III. Der Einfluß von Harmalin auf den 5-HT-Gehalt der Thrombozyten in vitro	32
F) Diskussion	34
I. Zur Bindung des 5-HT in Thrombozyten	34
II. Zum Mechanismus der Harmalin-Wirkung auf Thrombozyten	35
III. Harmalin und MAO-Hemmung	37
IV. Zum Mechanismus der Harmalin-Wirkung auf das ZNS	38
G) Zusammenfassung	40
H) Literaturverzeichnis	41

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
DPN	Diphosphopyridinnucleotid
5-HIAA1	5-Hydroxyindolacetaldehyd
5-HIE	5-Hydroxyindolessigsäure
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
5-HTP	5-Hydroxytryptophan
MAO	Monoaminoxydase, Monoamino: O ₂ oxydoreductase, Systemnummer nach I. B. U. (Intern. Union of Biochemistry) 1, 2, 3, 4.
NA	Noradrenalin
PIH	β-Phenylisopropylhydrazin
Ro 4-1284	2-Hydroxy-2-äthyl-3-isobutyl-9,10- dimethoxy-1,2,3,4,6,7-hexahydro- 11-b H-benzo[a]chinolizin
Ro 4-6861	4-Chloro-N-methyl-amphetamin

A) Einleitung

Stoffwechsel und Pharmakologie von 5-Hydroxytryptamin (5-HT, Serotonin) werden in zunehmendem Maße untersucht. Ungefähr 3000 Arbeiten sind über diese Substanz veröffentlicht worden, für die UDENFRIEND und Mitarbeiter 1955 zuverlässige Nachweis- und Bestimmungsmethoden ausgearbeitet hatten (1,2). Biosynthese (3-51) und Abbau (4,52-73) in vivo und in vitro wurden in den folgenden Jahren intensiv untersucht. Dabei wurde die weite Verbreitung dieses Stoffes im Tier- und Pflanzenreich festgestellt. Aufgrund der Kenntnis der pharmakologischen Eigenschaften von 5-HT wurden bisher bei annähernd 30 verschiedenen Krankheiten ein anomaler 5-HT-Gehalt im Blut oder eine veränderte Ausscheidung von Abbauprodukten gefunden.⁺ 5-HT liegt im Organismus nur zum Teil in freier Form vor, der größere Anteil ist pharmakologisch inaktiv in Zellorganellen gespeichert. Der Mechanismus der Speicherungs- und Freisetzungsvorgänge ist noch weitgehend unbekannt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einem Teil dieses Problems. Am Modell der Kaninchen-Thrombozyten wurden die Vorgänge bei Speicherung und Freisetzung von 5-HT unter dem Einfluß von Harmalin untersucht.

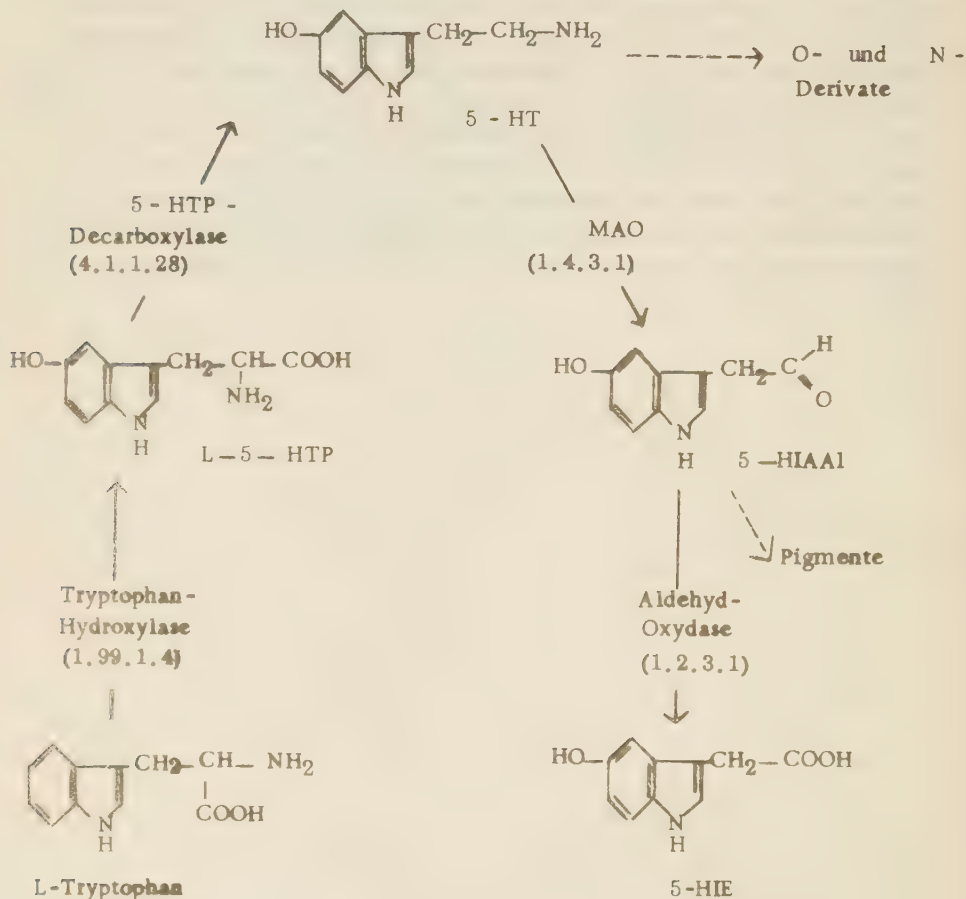
⁺ Übersicht bei ERSPAMER (76)

B) Theoretischer Teil

I. 5-Hydroxytryptamin.

1. Biosynthese und Abbau

In dem folgenden Schema⁺ sind Synthese und Abbau von 5-HT im Säugetierorganismus dargestellt:



⁺ Vereinfacht nach PLETSCHER und Mitarb. (132) und ERSPAMER (76). Die Zahlen in Klammern bedeuten die Systemnummer der Enzyme nach I. B. U.

Die Aminosäure L-Tryptophan kann zu Tryptamin decarboxyliert (74) oder am 4. bzw. 5. C-Atom des Indolrings hydroxyliert werden (3-6, 18), wodurch 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) entsteht.

Der Tryptophanhydroxylase schreiben verschiedene Autoren eine quantitätsbestimmende Rolle bei der Entstehung des 5-HT zu (6, 8, 75). Von allen untersuchten Geweben des Menschen enthalten nur die Mucosa des Gastrointestinaltraktes und das Nervengewebe diese L-Tryptophan-5-hydroxylase (76). 5-HT wird nur aus 5-HTP gebildet (4, 8, 25, 31), das beteiligte Enzym, die 5-HTP-decarboxylase, wirkt jedoch nicht streng substratspezifisch und scheint nach Auffassung mehrerer Autoren mit der Dihydroxyphenylalanin-(DOPA-) Decarboxylase identisch zu sein (32-35, 39-42). Die direkte enzymatische Hydroxylierung des Tryptamins ist nicht möglich (80). Der Abbau von 5-HT erfolgt zum größten Teil durch die Monoaminoxidase (MAO) zum 5-Hydroxyindolacetaldehyd (52-61). Diese Zwischenstufe kann entweder zu Pigmenten oder durch die Aldehyddehydrogenase zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIE) umgewandelt werden (8, 66, 81). Unter entsprechend günstigen Bedingungen verläuft die Entstehung von 5-HIE aus 5-HT quantitativ mit stöchiometrischer Reduktion von DPN (60). Die im Urin ausgeschiedene Menge an 5-HIE beträgt beim Menschen 1-10 mg/die (9, 58, 59, 82-84). Unverändertes 5-HT findet sich auch im Harn von Gesunden und soll 20-720 µg betragen können (85-87).

2. Physiologische Verteilung.

5-HT konnte 1940 von ERSPAMER und Mitarbeitern isoliert werden und wurde zunächst als "Enteramin" bezeichnet (85). Der Name deutet darauf hin, daß der größte Teil des Stoffes im Organismus in den enterochromaffinen Zellen der Darm-schleimhaut deponiert ist. Der Gehalt des Gastrointestinaltrakts variiert bei verschiedenen Säugetieren von 1-8 mg 5-HT pro Gramm Frischgewebe. Bei Kaninchen wurde im Durchschnitt die doppelte Menge gefunden (76).

Die Tagesproduktion des Menschen wird auf 5-20 mg geschätzt (68). Der Gehalt des Gehirns an 5-HT ist wesentlich niedriger als der des Darms. Er beträgt bei Säugetieren durchschnittlich 0,5-1 µg pro Gramm Frischgewebe (86). 5-HT überschreitet die Blut-Liquor-Schranke nicht (87-91), aber nach Injektion von 5-HTP erfolgt ein Anstieg des 5-HT im Gehirn. Die größte prozentuale Konzentration an 5-HT findet sich in Thalamus, Hypothalamus, substantia nigra und Putamen. Im ZNS wurde eine hohe Umsatzgeschwindigkeit festgestellt. Die Halbwertszeit für 5-HT beträgt nach UDENFRIEND ungefähr 10 Minuten (92).

Ein weiteres Depot für 5-HT stellen die Thrombozyten dar. In 10^9 dieser Zellen sind beim Menschen 0,3 - 0,9 µg 5-HT enthalten (93-97); Beim Kaninchen findet man ungefähr 8 mal soviel (98). Damit beläuft sich die Gesamtmenge des in den Thrombozyten eines Menschen vorhandenen 5-HT auf 0,5 bis 1 mg. Die Halbwert-

zeit beträgt 24-48 Stunden, das heißt, die Plättchen geben ihr 5-HT nur beim Zerfall frei (92,99). Die Annahme, nach der die Thrombozyten einen im Körper kreisenden 5-HT-Speicher darstellen, wird von ERSPAMER bezweifelt (76).

3. Wirkung von 5-HT.

Die Wirkung von 5-HT auf das Kreislaufsystem ist vielfältig und unterschiedlich. Am menschlichen Herzen in situ erfolgt auf 5-HT-Gabe Steigerung der Pulsfrequenz bei vermindertem Schlagvolumen. Der Blutausswurf ist dabei erhöht (100-103). Nach Verabreichung von 5-HT kann man sowohl Erhöhung, als auch Senkung des Blutdrucks beobachten. Dieser Effekt hängt ab von der Dosis, dem Applikationsweg des Amins und dem Tonus der Vasokonstriktoren. Überdies reagiert jede Tierart anders (85). Bei großen Gefäßen erhöht sich der Strömungswiderstand (104-108), während an normalen Kapillaren keine Veränderung zu beobachten ist (101,109-112).

Alle weiteren Organe mit glatter Muskulatur, wie Darm, Gallenblase, Bronchien, Uterus und Ureter reagieren nach 5-HT-Gabe mit Kontraktion. 5-HT ist als das Hormon des Darmes bezeichnet worden, welches die Peristaltik reguliert (85). Nach SMITH et al. (10) und LEMBECK (114) kann diese Wirkung als die physiologische Funktion des 5-HT angesehen werden.

Die Bedeutung des 5-HT im Gehirn ist nicht geklärt; Gegensätzliche Reaktionen wie Depression und Excitation und auch das Fehlen jeglicher Wirkung auf das ZNS sind nach Injektion von 5-HT beschrieben worden (85). Die Untersuchungsergebnisse über den Einfluß von 5-HT auf das EEG sind widersprechend. Die Beteiligung von 5-HT an der Funktion des Großhirns und bei psychischen Vorgängen ist bisher nur eine Vermutung, wird jedoch vielfach diskutiert (115).

4. Krankheitsbilder mit Veränderungen des 5-HT-Stoffwechsels.

Nach den bisherigen Ausführungen ist es verständlich, daß je nach dem Ausmaß einer Resektion im Gastrointestinaltrakt eine entsprechende Verminderung des 5-HT im Blut und der 5-HIE-Ausscheidung eintritt (116-118). Beim Carcinoid-Syndrom dagegen wird der Organismus wegen einer pathologischen Vermehrung der enterochromaffinen Zellen periodisch mit 5-HT und den Produkten des 5-HT-Stoffwechsels überschwemmt (9,119-125).

Bei anderen pathologischen Zuständen ist der Zusammenhang zwischen den veränderten 5-HT-Werten und den klinischen Symptomen völlig ungeklärt; bekannte Krankheitsbilder, die mit erniedrigtem 5-HT-Gehalt des Blutes bzw. der Thrombozyten einhergehen, sind die myeloische und lymphatische Leukämie (126), Eisenmangel- und perniciose Anämie, Myelofibrose, Purpura thrombopenica, M. Osler und rheumatische Arthritis (97,127). Bei der Phenylketonurie finden sich im Blut bzw. Urin nur die Hälfte des normalen Gehalts an 5-HT bzw. 5-HIE (128). Beim M. Hodgkin ist der Thrombozytengehalt erniedrigt, der Blutspiegel an 5-HT aber

normal; bei der hämorrhagischen Thrombozytämie findet sich bei erniedrigtem Plättchengehalt eine erhöhte Blutkonzentration an 5-HT (76). Deutlich gesteigerte 5-HT-Werte im Serum wurden auch bei cerebralen Lähmungen, Röteln, Dysostosis multiplex und Lipidstoffwechselstörungen des Gehirns festgestellt. In bestimmten Abschnitten des Gehirns ist der 5-HT-Gehalt beim M. Parkinson um etwa die Hälfte vermindert, ebenso die Werte für Noradrenalin (NA) und Dopamin (129). Retinoblastom und Ganglioneurom zeigen vermehrten 5-HT-Gehalt im Tumorgewebe (130). Der Liquorspiegel an 5-HT bei Kindern mit Tuberkulose ist erhöht (131).

II. Beeinflussung des Stoffwechsels biogener Amine.

1. Monoaminoxydase.

Das wichtigste Enzym im Abbau der biogenen Amine ist die MAO. Sie ist in unterschiedlichen Mengen bei fast allen Säugetieren nahezu im gesamten Organismus verbreitet (Übersicht bei PLETSCHER und Mitarbeitern (132)).

MAO ist nicht substratspezifisch. Außer sämtlichen biogenen Monoaminen werden z.B. auch höher aliphatische Diamine angegriffen. Die Aktivität des Enzyms ist so hoch, daß die in den einzelnen Geweben vorhandenen Monoamine innerhalb weniger Minuten oxydativ desaminiert werden können (133). Andererseits ist die Gesamtmenge an Aminen physiologischerweise im Körper gleichbleibend. BRODIE folgert daraus, daß die gespeicherten biogenen Amine zumindest zeitweise dem Stoffwechsel entzogen sind (134).

Ob die Bindung in der Zelle bei der Inaktivierung der Amine in den Speicherorten eine Rolle spielt, ist nicht bekannt, da über die Bindungspartner nur Vermutungen geäußert werden können (78).

Die Freisetzungsmechanismen sind ebenso weitgehend ungeklärt. Zur Erforschung dieser Probleme sind zahlreiche Versuche sowohl mit Substanzen, die Amine aus ihren Körperdepots freisetzen als auch mit MAO-Inhibitoren gemacht worden.

2. Liberatoren der biogenen Amine.

Eine amin-freisetzende Eigenschaft wurde zuerst beim Reserpin entdeckt, das neben Histamin und NA (135) besonders leicht 5-HT aus Thrombozyten, Dann und Hirn liberiert (136-140). In vivo sind die freien Amine dem Angriff der MAO ausgesetzt und werden schnell abgebaut. Folglich nimmt nach Applikation von Reserpin der Uringehalt an Abbauprodukten, von Aminen z.B. 3,4-Dihydroxymandelsäure (141, 142) und 5-HIE (137, 143-149), zu. Die Ursache dafür liegt entweder in der Verminderung des Bindungsvermögens der Zellen (150, 151) oder in der gestörten Aminaufnahme ohne Beeinträchtigung des Umsatzes der vorhandenen

Amine (152, 153). Dieser Effekt kann außer bei Reserpin auch noch bei Alkaloiden, Rescinnamin, 11-Desmethoxyreserpin und Raunescin festgestellt werden (154). Ähnlich wirken die Benzochinolizinderivate Tetrabenazin (155) und Ro 4-1284. Weitere Stoffe, die 5-HT aus Thrombozyten freisetzen, sind Tyramin, Amphetamin, Chlorpromazin und Ro 4-6861 (156-157).

Die Eigenschaft des Nikotin, Catecholamine aus dem Nebennierenmark freizusetzen ist schon seit langem bekannt (158-161). Ebenso wurde die Liberierung von NA durch Nikotin im ZNS beschrieben (162). SCHIEVELBEIN hat erstmals die Freisetzung von 5-HT und Histamin aus Thrombocyten durch Nikotin und Lobelin nachgewiesen. Nikotin hemmt die MAO nicht. Es ist nicht bekannt, ob weitere, als **Liberatoren** von 5-HT wirksame Substanzen wie Nomikotin, Meskalin, Anabasin, Heroin und Morphin als MAO-Hemmer wirksam sind (77).

3. Monoaminoxidase-Hemmer.

MAO-Hemmer wirken teilweise antagonistisch zu den Liberatoren der biogenen Amine. Im Blut, Dünndarm und Gehirn ist eine Zunahme an biogenen Aminen nach Applikation verschiedener Inhibitoren zu beobachten. Iproniazid ist der zuerst entdeckte und am eingehendsten untersuchte Vertreter dieser Stoffgruppe (163-165). An einer großen Anzahl weiterer Hydrazinderivate wie Nialamid und PIH konnte die Hemmung der MAO *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden (132, 166).

Die MAO-Inhibitoren unterscheiden sich nach Stärke, Dauer und Organaffinität in ihrer Wirkung.

Die MAO-Hemmer, die nicht vom Hydrazintyp sind, wirken mit Ausnahme von 2-Phenylcyclopropylamin (SKF-235) nur *in vitro*. Als Beispiele seien Pentamindin (167), p-Tolylcholinäther (168), Ephedrin (169-172) und D-Amphetamin (170-172) genannt. Sie beeinflussen die Wirkung der 5-HT-Freisetzer nicht.

Die Hemmung aller genannten *in vivo* wirksamen Inhibitoren ist praktisch irreversibel.

Harmalin und seine Derivate erkannte UDENFRIEND und Mitarbeiter als starke MAO-Inhibitoren, sowohl *in vitro*, wie *in vivo*. Es unterscheidet sich von den Hydrazinen durch seine *in vivo* kürzere Wirkungsdauer. Außerdem ist die Hemmung der MAO reversibel (176). Harmalin hemmt nach LONG und LESSIN die Aufnahme von 5-HT durch Thrombozyten (177).

Die aminliberierende Wirkung von Nikotin kann durch Nialamid, einen MAO-Hemmer vom Hydrazin-Typ, gehemmt werden (79, 98). Es war bisher nicht entschieden, ob diese Hemmung der aminliberierenden Wirkung, die sich auch auf die Reserpinwirkung erstreckt, auf eine Beeinflussung der Aktivität der Monoaminoxidase zurückzuführen ist. Aus diesem Grunde liegt es nahe, einen MAO-Inhibitor einzusetzen, welcher nicht vom Hydrazin-Typ ist. Als geeigneter MAO-Hemmer bot sich das

Harmalin an.

III. Harmalin.

1. Vorkommen.

Harmalin ist ein Alkaloid aus *Peganum harmala*, einer im Orient beheimateten Pflanze (Steppenraute). Es ist identisch mit einem aus dem Holz von *Banisteria caapi* isoliertem Stoff, der nach dieser südamerikanischen Lianenart den Namen Banisterin erhielt und aus welchem von Eingeborenen ein berauschendes Getränk bereitet wird (178).

2. Wirkung.

Dosen über 40 mg erzeugen beim Menschen psychomotorische Erregung und Halluzinationen (178-181).

An weiteren Wirkungen sind Blutdruckabfall durch Herabsetzung der Herzkraft (182), Bradykardie (183, 184) und Temperatursenkung (185, 186) bekannt. Therapeutische Versuche wurden gemacht bei Angina pectoris wegen des koronarerweiternden Effekts (187) und bei M. Parkinson wegen der günstigen Beeinflussung von Rigor und Hypokinesie (188, 189). Der bei diesem Krankheitsbild auftretende Tremor wird durch Harmalin nicht verändert (183).

3. Interferenz von Harmalin mit 5-HT-Liberatoren und MAO-Hemmern.

Die Einzelwirkung von Reserpin, Iproniazid und Harmalin auf den 5-HT-Gehalt des Gehirns zeigt Abb.1:

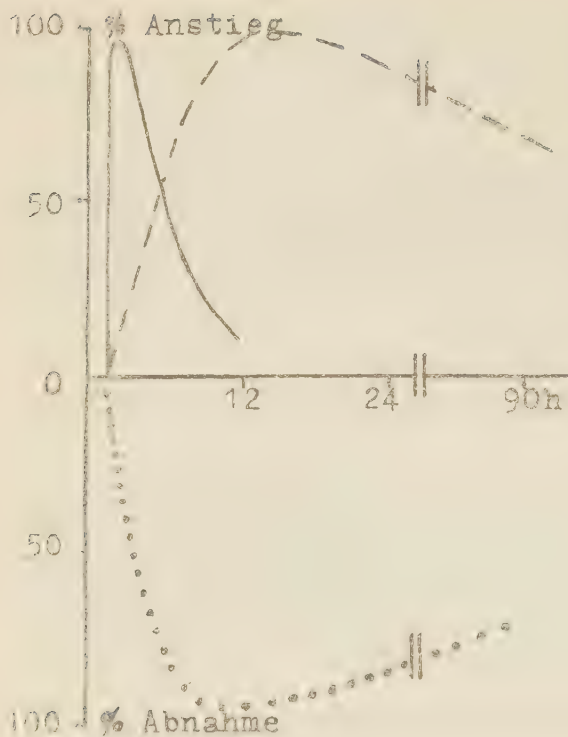


Abb. 1: Wirkung von
 — Harmalin (30 mg/kg i.p.)
 - - - Iproniazid (100 mg/kg i.p.)
 . . . Reserpin (3 mg/kg i.p.)
 auf den 5-HT-Gehalt des
 Rattenhirns
 (nach PLETSCHER und Mitarb.)
 (132, 190, 191)

Harmalin und Iproniazid sind in der Lage, den nach Reserpingabe abgesunkenen 5-HT-Spiegel des Gehirns zu wesentlich schnellerem Wiederanstieg zu bringen (192-194) (Abb. 2 und 3)

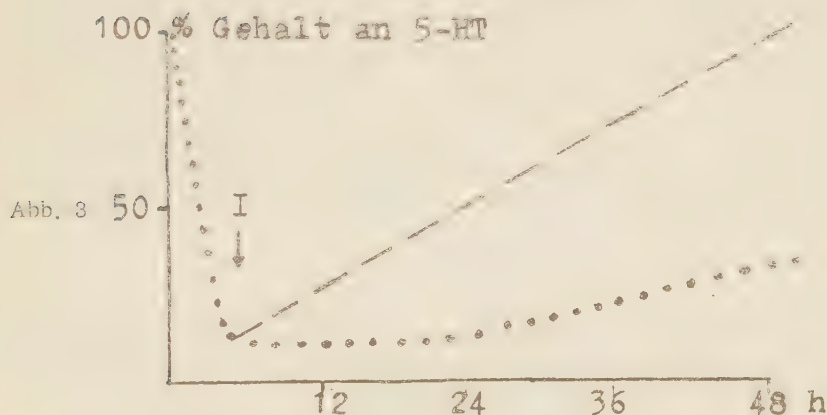
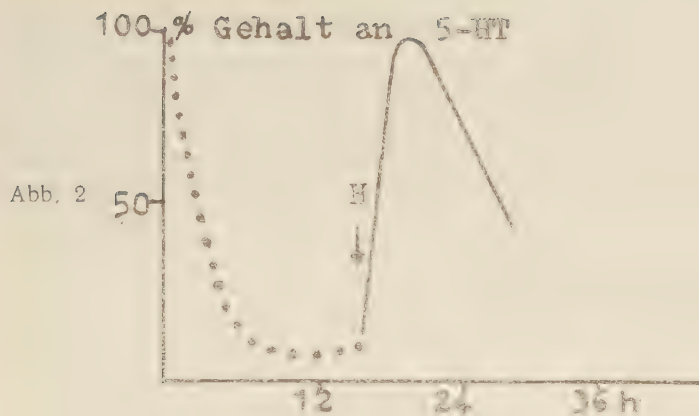


Abb. 2: Einfluß von Harmalin
(H↓ — 30 mg/kg i. p.)
auf den 5-HT-Gehalt des
Gehirns von Ratten
nach Vorbehandlung mit Reserpin (..... 3 mg/kg i. p.)
(nach PLETSCHER und Mitarb. (132)).

Abb. 3: Einfluß von Iproniazid
(I↓ - - -) 100 mg/kg i. p.)
auf den 5-HT-Gehalt des
Gehirns von Kaninchen

Auf Vorbehandlung mit Harmalin bzw. Iproniazid folgt eine Verhinderung des sonst auf Reserpin eintretenden 5-HT-Abfalls (193, 195-198).

Nach SPECTOR und Mitarbeitern sind diese Erscheinungen so zu erklären, daß die MAO-Hemmer Reserpin nicht daran hindern, 5-HT von seinem Bindungspartner zu trennen, sondern lediglich den schnellen Abbau des freigesetzten Amins unmöglich machen (199).

Abgesehen davon ist die resultierende Wirkung als Summe der Einzelwirkungen nach Abb. 1 aufzufassen. Schwieriger zu deuten ist der von PLETSCHER und Mitarbeitern beschriebene Antagonismus zwischen Harmalin und Iproniazid (200): Vorbehandlung mit Harmalin verhindert den sonst nach Iproniazid verursachten Anstieg von 5-HT im Rattenhirn, jedoch nur, wenn der Zeitunterschied in der Applikation der beiden Stoffe 1/2 - 6 Stunden beträgt. Die Abb. 4 zeigt den 5-HT-Gehalt des Gehirns in Abhängigkeit von der Dosis der Harmalin-Vorbehandlung vor der Iproniazid-Gabe

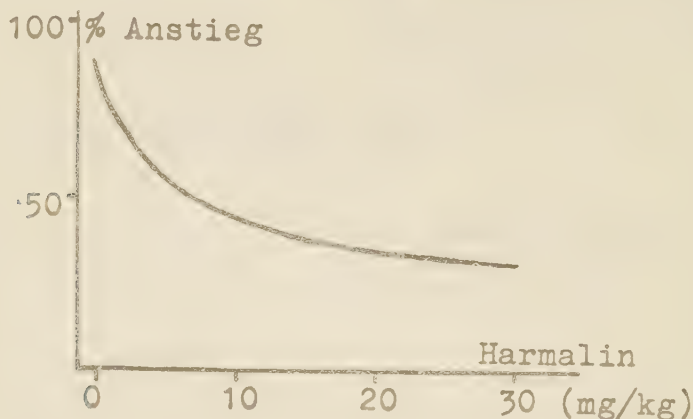


Abb. 4: 5-HT-Gehalt des Rattenhirns nach Applikation von Iproniazid (100 mg/kg i. p. 1 h nach Harmalin in variabler Dosis i. p.)
6-HT-Messung 16 h nach Iproniazid
(Vereinfacht nach PLETSCHER und Mitarb. (200)).

Die Autoren hielten eine Konkurrenz der lang- und kurzwirkenden MAO-Hemmer um das Enzym für die Ursache dieser Erscheinung (175).

MURPHY und CHINN konnten nachweisen, daß außerdem die Wirkungsdauer des reversiblen Inhibitors und die Anwesenheitsdauer des irreversiblen Hemmers von Bedeutung ist. Der Antagonismus ist nämlich nicht komplett, wenn die Aktivität des irreversiblen Hemmers länger anhält als die des reversiblen Inhibitors (201).

Weiter wurde in Vorversuchen beobachtet, daß Harmalin die Wirkung von Nikotin auf die 5-HT-Freisetzung aus isolierten Kaninchen-thrombocyten nicht hemmt, sondern im Gegenteil die Wirkung verstärkt. Es wurde daraus geschlossen, daß Harmalin selbst eine liberierende Wirkung für 5-HT besitzt (SCHIEVELBEIN, persönliche Mitteilung).

C) Problemstellung

Die Wirkung von MAO-Hemmern vom Hydrazin-Typ auf die Liberierung von biogenen Aminen durch Nikotin und Lobelin ist von SCHIEVELBEIN und Mitarbeitern eingehend untersucht worden. Es stellt sich die Frage, ob diese Wirkung der MAO-Inhibitoren den Schluß auf eine Beteiligung dieses Enzyms bei der Speicherung und Freisetzung von biogenen Aminen in Thrombozyten und anderen Depots des Organismus zulassen. Es war daher Aufgabe dieser Arbeit zu prüfen, ob

1. MAO-Hemmer mit anderer chemischer Struktur die gleichen Wirkungen bei der 5-HT-Freisetzung ausübt, wie die Inhibitoren vom Hydrazin-Typ, wobei als Modellsubstanz Harmalin als Indolderivat eingesetzt werden sollte. Bei dieser Gelegenheit sollte
2. untersucht werden, ob sich die in orientierenden Versuchen festgestellte Freisetzungswirkung des Harmalins (siehe Seite 10) bestätigen läßt und ob sie mit derjenigen anderer Liberatoren, insbesondere des Nikotins, vergleichen läßt

D) Methoden

I. Thrombozytengewinnung für in-vitro-Versuche. (Nach S. WITTE (202))

Mit Butylallyonal narkotisierte Kaninchen von 3,5 - 4,0 kg Gewicht wurden aus der freigelegten A. carotis durch PVC-Katheter entblutet. In Kunststoffbehältern wurde zur Gerinnungsverhütung 3,8 %ige Natriumcitratlösung im Überschuß vorgelegt. Anschließend wurde 15 Min. lang bei einer Temperatur von 4°C mit $700 \times g$ zentrifugiert und das überstehende thrombozytenhaltige Plasma von den übrigen sedimentierten Zeitelementen des Blutes abgehebert. Alle Ansätze wurden durch Vermischen mit physiologischer NaCl-Lösung auf eine konstante freisetzbare 5-HT-Menge und damit annähernd konstante Thrombozytenmenge eingestellt. Als Bezugspunkt zur quantitativen Erfassung der Vorgänge wurde nicht die in 1 ml Plasma enthaltene Thrombozytenzahl gewählt, sondern in vereinfachter, jedoch gut reproduzierbarer Weise die aus 1 ml thrombozytenreichen Plasma optimal freisetzbare 5-HT-Menge.

Zu diesem Zweck wurde in einem Vorversuch der in 1 ml Plasma freisetzbare 5-HT-Gehalt bestimmt. Jeweils 6 mal 100 ml dieser Verdünnung wurden zusammen mit den zu untersuchenden Substanzen 60 Min. lang im Wasserbad von 37°C inkubiert. Danach wurden daraus durch 35 minütiges Zentrifugieren bei $3000 \times g$ die Thrombozyten isoliert. Die sedimentierten Plättchen wurden in 100 ml physiol. NaCl-Lösung resuspendiert und bei gleicher Drehzahl und Dauer zentrifugiert. Um störende Stoffe auszuwaschen, wurde dieser Vorgang ein zweites Mal wiederholt.

II. Thrombozytengewinnung für in-vivo-Versuche.

Da von einem Kaninchen mehrmals in bestimmten Zeitabständen nach i. v. Injektion der verschiedenen Substanzen jeweils 20 ml Blut entnommen werden mußte, wurde 0,60 M-Natriumcitratlösung festes Hepain verwendet, um die von vorneherein zur Verflüssigung stehende geringere Plasmamenge nicht zusätzlich zu verdünnen. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie unter I. angegeben.

III. Bestimmung von 5-HT in Thrombozyten.

1. Colorimetrische Methode.

Der 5-HT-Gehalt der nach I. gewonnenen Thrombozyten konnte colorimetrisch nach HENFRIEND und Mitarb. gemessen werden (2). Das nach dreifachem Zentrifugieren erhaltene Thrombozyten-Sediment wurde durch Zufügen von 1 ml 10 %iger Trichloroessigsäure aufgeschloßen und enteiweißt. Das Sediment wurde abzentrifugiert und

das 5-HT im Überstand colorimetrisch bestimmt. Dazu wurde der Überstand mit 1 ml einer 10 %igen α -Nitroso- β -naphthol-Lösung versetzt. Sodann wurde 1 ml 2n H_2SO_4 , in der 1 mg Natriumnitrit gelöst war, hinzugefügt. Nach kurzem Erwärmen auf ca. $50^\circ C$ wurde mit je 10 ml Essigsäure-Äthylester zweimal ausgeschüttelt und die Extinction der Extrakte im Photometer EPPENDORF bei 546 m μ gemessen. Auf einer Eichkurve (Abb. 5) konnte der 5-HT-Gehalt abgelesen werden.

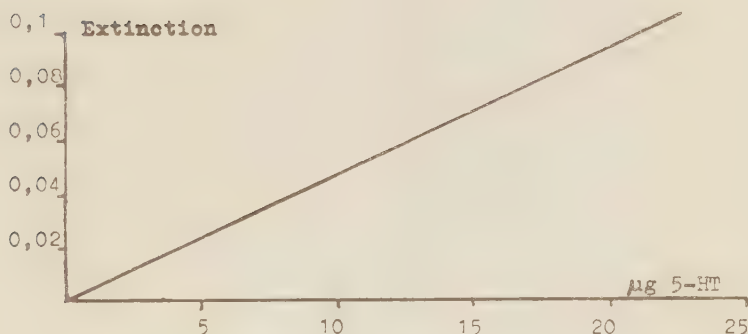


Abb. 5: Eichkurve für 5-HT in 3 ml Volumen ($NaNO_2$ in H_2SO_4 , Trichloressigsäure, α -Nitroso- β -naphthol) für colorimetrische Bestimmung.

2. Fluorimetrische Methode.

Da nach Zufügen von Harmalin die in den Thrombozyten auffindbare 5-HT-Menge wesentlich geringer war, mußte das empfindlichere Verfahren der Fluorimetrie zur 5-HT-Bestimmung angewandt werden. Dabei zeigte Harmalin ebenfalls eine störende Fluoreszenz (s. S. 23) und mußte deshalb von 5-HT abgetrennt werden. Von mehreren für 5-HT und Derivate angegebenen Trennverfahren erwies sich eine nach MACEK und VANEČEK modifizierte Methode geeignet (203):

0,2 ml des entweißten klaren Überstandes wurde auf Chromatographie-Papier Nr. 2043b der Fa. Schleicher & Schüll aufgetragen und im Fließmittel n-Amylalkohol-Eisessig-Wasser (4:1:5) absteigend entwickelt. Die Laufzeit betrug 14 Stunden. Harmalin wanderte fast mit der Lösungsmittelfront, für 5-HT ergab sich ein mittlerer R_f -Wert von 0,16.

Zum Anfärben des als Standard aufgetragenen Extraktes und Kreatinin-Sulfat-serotonins wurde 4-Dimethylaminobenzaldehyd-Salzsäure (VAN-URK-Reagens) verwendet (204). Unter dem Einfluß der im Extrakt enthaltenen Stoffe erhielt man keinen einheitlichen Fleck, sondern es trat Schwanzbildung auf; wie Abb. 6 zeigt, handelt es sich jedoch um 5-HT.



Abb. 6 Links: Chromatogramm des extrahierten 5-HT.

1 = 100 μ g Serotonin-Creatinin-Sulfat

5 = 0,1 ml Extrakt + 100 μ g "

6 = " + " + 10 μ g Harmalin

Rechts: Rechromatogramm der ausgeschnittenen Zonen

(Maßstab 1:3; aus foto-technischen Gründen ist die

Fließmittelfront nicht dargestellt, sie befindet sich ca. 3 cm oberhalb d. oberen Bildrandes, wo auch Harmalin zu lokalisieren ist.)

Die den Farbflecken des benachbarten Streifens entsprechenden Zonen wurden ausgeschnitten und daraus das 5-HT mit 0,1n HCL eluiert. Der Gehalt an 5-HT wurde im Eluat am ZEISS-Fluorimeter PMQ II bei den Wellenlängen 295 m μ als Anregung und dem Fluoreszenz-Maximum von 345 m μ nach der Eichkurve der Abb. 7 bestimmt (1).



Abb. 7: Eichkurve für 5-HT in 3 ml H CL
(ohne Verstärkung, Stufe 5, Spalt je 1,0)
für fluorimetrische Bestimmung.

Fluoreszenz-Charakteristik und Rechromatographie des Eluats wurden benützt, um die Identität mit 5-HT zu sichern.

Die unter UV-Licht auftretende Fluoreszenz konnte zur direkten Lokalisation des ungefärbten 5-HT nicht benutzt werden, da der 5-HT-Gehalt in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer abnimmt; Die Halbwertszeit dieses Vorgangs liegt bei der verwendeten Lichtquelle bei 2,5 Minuten.

Die Ausbeute der direkten Messungen schwankte zwischen 80 und 90 %, nach Extraktion und Chromatographie zwischen 40 und 50 %. Diese beiden Methoden

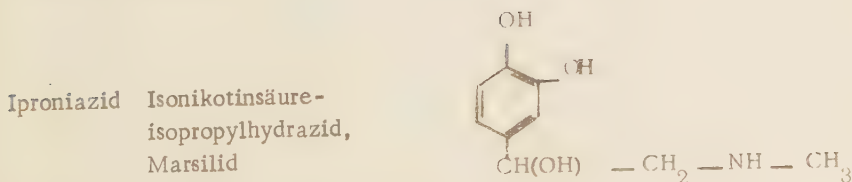
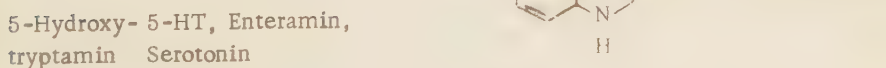
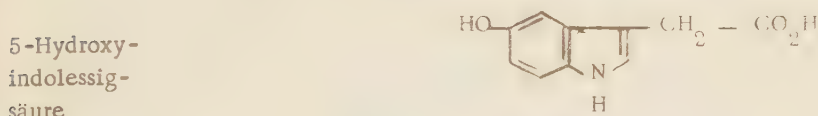
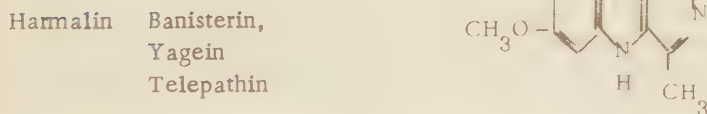
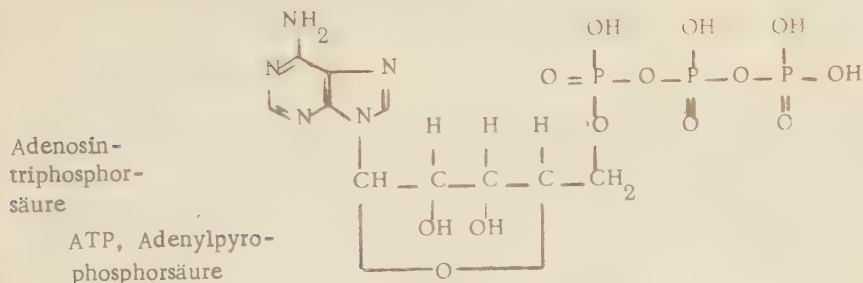
eignen sich auch für die quantitative Bestimmung des durch in gleicher Weise isolierte Thrombozyten speicherbaren Serotonins. Alle angegebenen 5-HT-Werte sind bezogen auf gemessene Leerwerte, die den gleichen genannten Verfahren unterworfen wurden.

IV. Bestimmung des Harmalins.

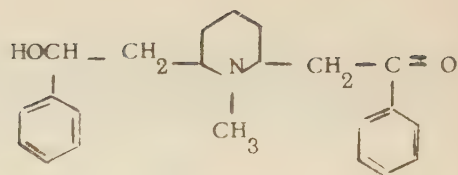
Zur Bestimmung der Harmalinkonzentration im Plasma wurde sein ausgeprägtes Fluoreszenzspektrum benutzt. In saurem Milieu liegen die Wellenlängen für das Anregungsmaximum bei 390 m μ mit einem Emissionsmaximum bei 490 m μ (205). Für den Nachweis der von den Thrombozyten aufgenommenen Harmalin-Menge genügt infolge der guten Fluoreszenzeigenschaften eine Schätzung der Fleckengröße auf dem Chromatogramm.

V. Verzeichnis der eingesetzten Substanzen

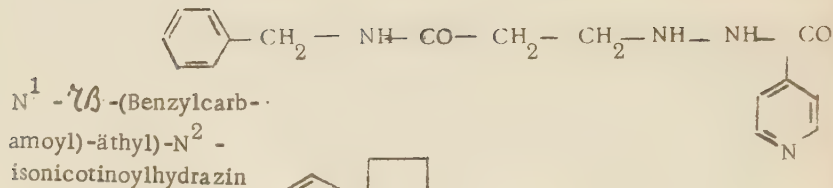
mit häufig gebrauchten Trivialnamen, Synonyma und Strukturformeln.



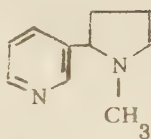
Lobelin



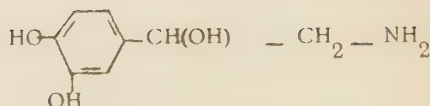
Nialamid



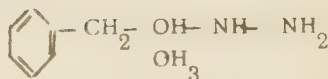
Nikotin



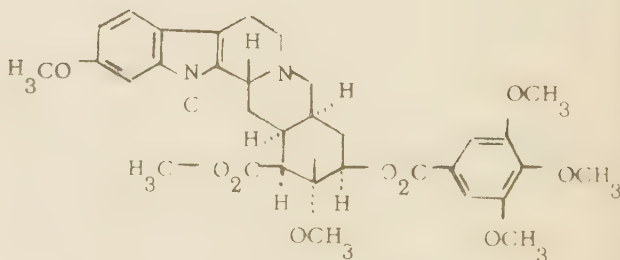
Noradrenalin Norepinephrin,
 Dihydroxyphenyl-
 aminoäthanol



Pheniprazin β -Phenyliso-
 propylhydrazin



Reserpin



E) Ergebnisse

I. Freisetzung von 5-HT aus Thrombozyten in vitro.

1. Spontanfreisetzung.

Die Abnahme des 5-HT in Leeransätzen beträgt $19 \pm 1,5$ % in 1 Std. . Sie ist außer von der Inkubationszeit noch abhängig vom p_H -Wert und der Temperatur. Deshalb wurden für den Standard-Ansatz folgende Bedingungen gewählt: Inkubationsdauer 1 Std. , Temperatur 37°C , p_H des Inkubationsmediums 7,4 und 5×10^{-4} molare Harmalinkonzentration. Bei der Berechnung der Ergebnisse wurde die Spontanfreisetzung entsprechend berücksichtigt.

2. Der Einfluß der Harmalin-Konzentration.

5-HT wird aus Thrombozyten durch Harmalin freigesetzt. Dabei nehmen die Thrombozyten Harmalin auf. Die Freisetzung von 5-HT aus Thrombozyten ist proportional der Harmalinkonzentration. Meßbare Serotonin-Mengen werden beginnend bei einer Konzentration von 5×10^{-5} M freigesetzt. 50 % des freisetzbaren 5-HT werden in einer $2,5 \times 10^{-4}$ molaren Lösung liberiert. Bei Steigerung der Harmalin-Konzentrationen nimmt die prozentuale Freisetzung langsam zu. Sie beträgt z. B. bei einer 10^{-3} molaren Lösung 85 % der optimal freisetzbaren 5-HT-Menge.

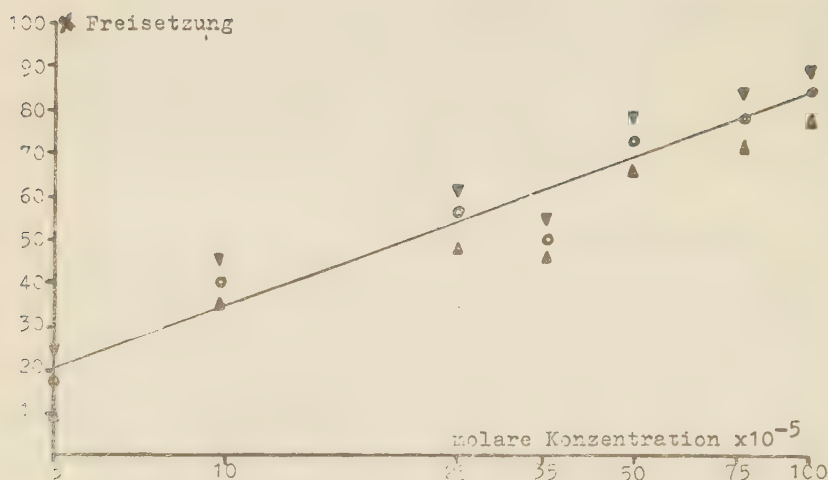


Abb. 3: Ordinate: freigesetztes 5-HT in % der vorhandenen Menge
Abszisse: Harmalinkonzentration
(Δ sind die Grenzen der Standardabweichungen)

3. Der Einfluß der Temperatur.

Abb. 4 zeigt die Abhängigkeit der Serotoninfreisetzung von der Inkubationstemperatur. Wenn bei einer Temperatur von $+10^{\circ}\text{C}$ werden meßbare 5-HT-Mengen freigesetzt. Die Freisetzung nimmt mit steigender Temperatur linear zu und erreicht bei $+45^{\circ}\text{C}$ einen Wert von 85 %. Über diesen Bereich hinausgehende Werte sind wegen der Unsicherheit behaftet, da die abzuziehenden Leerwerte wahrscheinlich wegen Thrombozytenschädigungen stark schwanken.

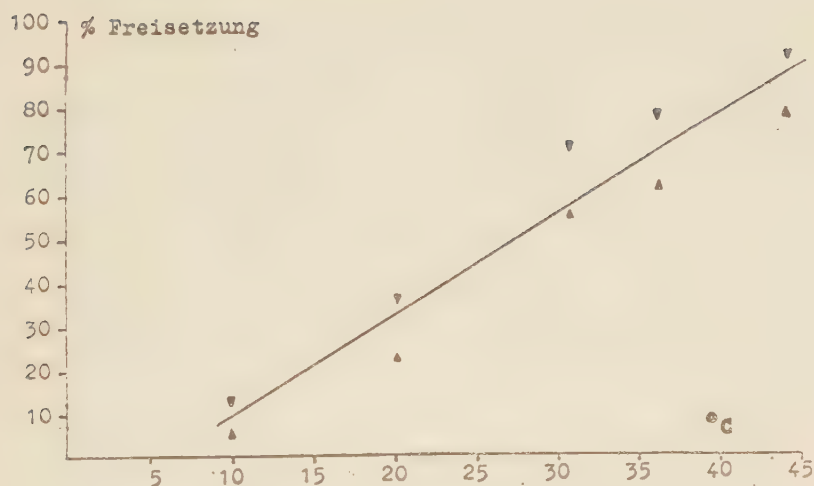


Abb. 9: Der Einfluß der Temperatur (Abszisse) auf die 5-HT-Freisetzung (Δ sind die Grenzen der Standardabweichungen)

4. Der Einfluß der Wasserstoff-Ionen-Konzentration.

Im Bereich zwischen p_H 6,5 und 8,5 kann eine proportionale Freisetzung beobachtet werden. Außerhalb der angegebenen Grenzen macht auch bei Verwendung von isotonischem Puffer eine wahrscheinlich Schädigung der Thrombozyten eine Messung unmöglich. Abb. 10 zeigt die zunehmende Freisetzung bei steigendem p_H -Wert.

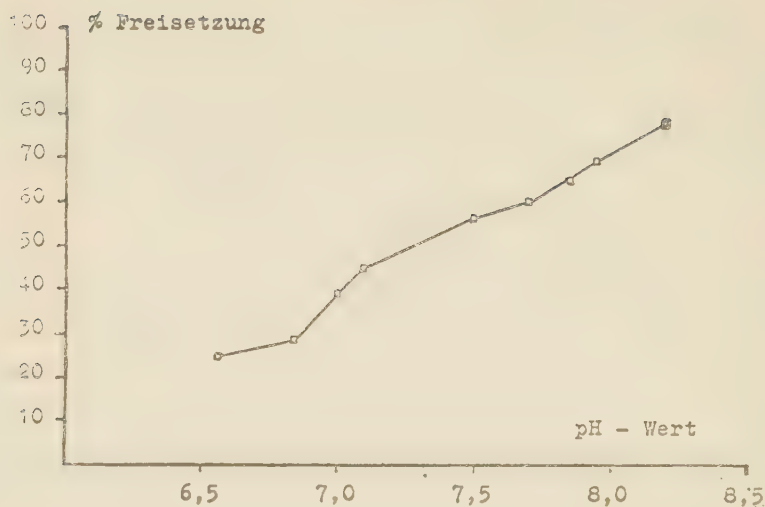


Abb. 10: Abhängigkeit der 5-HT-Freisetzung vom p_H -Wert.

5. Der Einfluß von N_2 - und O_2 -Atmosphäre.

Die Abwesenheit von Sauerstoff beeinflusst die Freisetzung von 5-HT aus isolierten Thrombozyten nicht. Bei Inkubation in Luft bzw. bei reiner N_2 - oder O_2 -Atmosphäre trat die gleiche prozentuale Freisetzung auf.

6. Der Einfluß verschiedener MAO-Hemmer und Nikotin auf die 5-HT-Freisetzung durch Harmalin.

Hierzu untersuchenden Substanzen wurden in verschiedenen Konzentrationen gleichzeitig den Harmalin-Ansätzen unter folgenden Standardbedingungen zugefügt:

$t = 1$ Std.; $T = 37^\circ C$; $p_H 7,4$; die Konzentration des Harmalins beträgt in allen Ansätzen $3,5 \times 10^{-4} M$.

Die Konzentrationen der Liberatoren wurden so gewählt, daß Ansätze mit vergleichbaren freigesetzten 5-HT-Mengen zustande kamen. Nialamid und Marsilid haben keinen Einfluß auf die Freisetzung von 5-HT, wie die Tabellen 1 und 2 zeigen:

Tabelle 1:

Tabelle 2:

Harmalin ($3,5 \times 10^{-4}$ molar)

<u>Nialamid</u>	Freisetzung	<u>Marsilid</u>	Freisetzung
molare Kon- zentration	von 5-HT in %	molare Kon- zentration	von 5-HT in %
0	48	0	49
0,0001	46	0,00035	48
0,0003	46	0,0007	52
0,0005	47	0,004	57
0,001	43	0,013	50
0,003	42		
0,006	45		
0,01	48		

Bei Nikotin ergibt sich eine Summation der Wirkungen, die allerdings nicht additiv ist, wie Tabelle 3 erkennen läßt:

Tabelle 3:

<u>Nikotin</u>	<u>Harmalin</u>	Freisetzung
molare	Konzentration	von 5-HT in %
0	0,00035	53
0,004	0	52
0,004	0,00035	73
0,004	0,0005	83

Tabellen 1-3: Der Einfluß verschiedener Substanzen auf die 5-HT-Freisetzung durch Harmalin.

II. Hemmung der Aufnahme von 5-HT in Thrombozyten durch Harmalin in vitro.

Normale isolierte sowie durch irgendwelche Verfahren entseicherte Kaninchen-Thrombozyten nehmen im Plasma vorhandenes 5-HT über ihren physiologischen Gehalt hinaus auf. Dieser Vorgang ist abhängig von der vorliegenden 5-HT-Konzentration (Abb. 11b), Temperatur, Inkubationsdauer (Abb. 11a) und p_H .

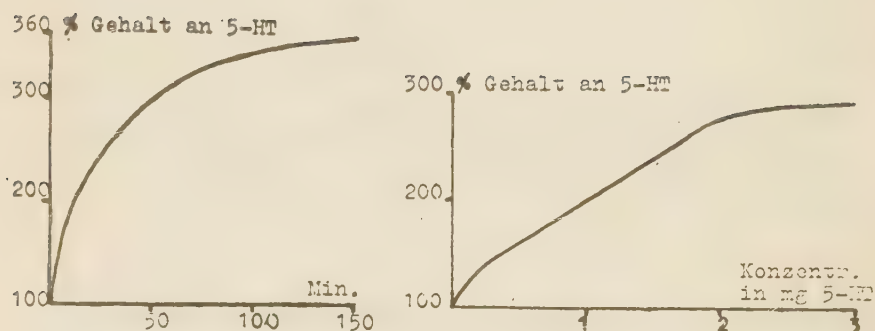


Abb. 11: Abhängigkeit der 5-HT-Aufnahme durch Thrombozyten
a) von der Inkubationsdauer b) von der 5-HT-Konzentration

Durch Zufügen von Harmalin kann der Prozeß gehemmt werden. Die Abhängigkeit der Hemmung von der Harmalin-Konzentration zeigt Abb. 12. Eine 10^{-4} molare Harmalin-Lösung verhindert jegliche Aufnahme aus einer 5×10^{-4} molaren 5-HT-Lösung. Höhere Harmalin-Konzentrationen bewirken Freisetzung. Die Hemmung der Aufnahme beträgt noch 30 %, wenn die Harmalin-Konzentration um 2 Potenzen abnimmt. In diesem Bereich nähert sich die Kurve der Abszisse.

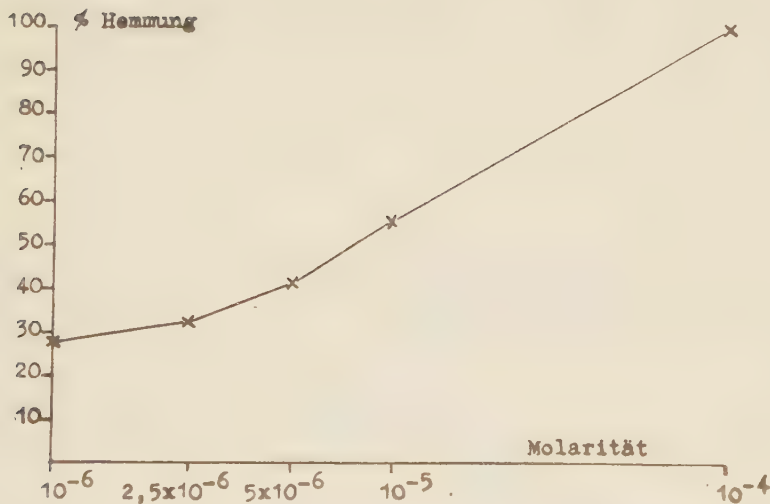


Abb. 12: Abhängigkeit der Aufnahmehemmung von 5-HT von der Harmalin-Konzentration (5-HT-Konzentration 5×10^{-4} molar = 0,2 mg/ml)

Diese Harmalin-Wirkung wird durch die MAO-Hemmer Marsilid und Nialamid ebenso wie die Freisetzung nach den durchgeführten Untersuchungen nicht beeinflusst.

III. Der Einfluß von Harmalin auf den 5-HT-Gehalt der Thrombozyten in vivo.

Um den Effekt des Harmalins auf den 5-HT-Gehalt der Thrombozyten in vivo zu prüfen, wurde einem 5 kg schweren Kaninchen nach Entnahme einer Leerwertprobe 18 mg/kg Harmalin intravenös injiziert. Dann wurde das 5-HT in den Thrombozyten der zu 5 verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Blutmenge (20 ml) bestimmt. Gleichzeitig wurde in diesen Blutproben der Harmalin- und Serotoninspiegel im Plasma gemessen und der Hämatokritwert kontrolliert, um eine mögliche Verschiebung zwischen Plasma und Blutkörperchen, die einen veränderten 5-HT-Gehalt vortäuschen würde, ausschließen zu können.

Die Ergebnisse sind aus Abb. 13 ersichtlich:

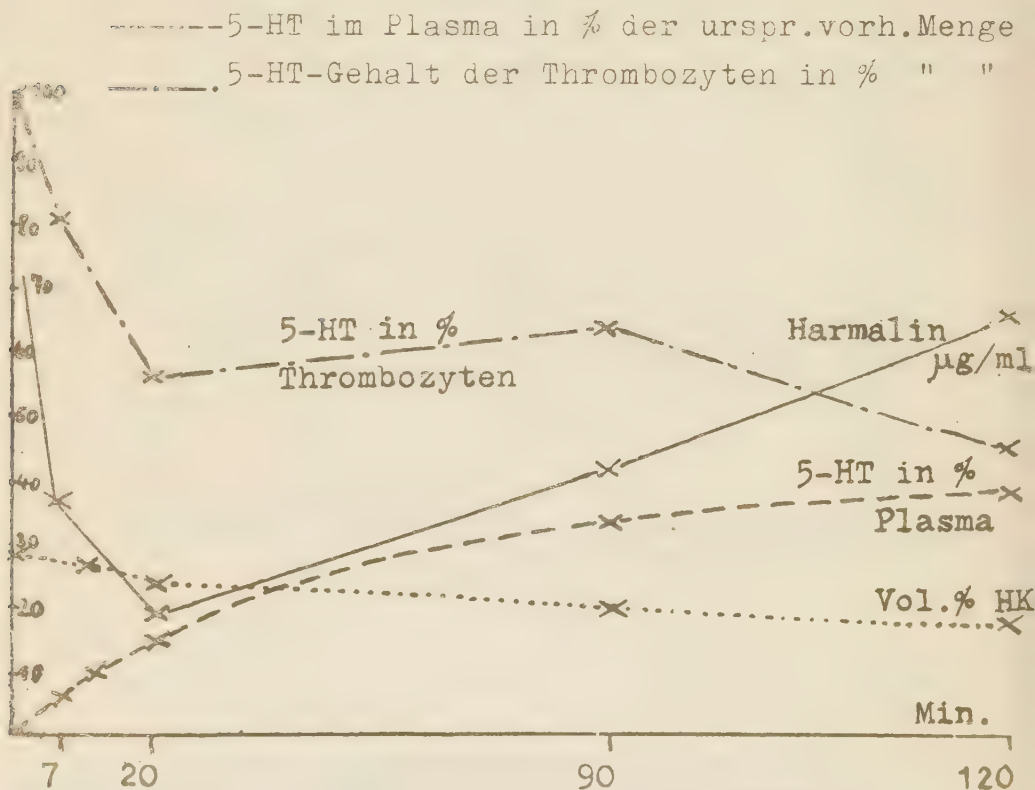


Abb. 13: Wirkung von Harmalin in vivo (Kaninchen) nach 18 mg/kg i. v.

..... Hämatokritwert

— Harmalinspiegel im Plasma

----- 5-HT im Plasma in % der urspr. vorh. Menge

- - - - - 5-HT-Gehalt der Thrombozyten in % der urspr. vorh. Menge

Die gemessenen Veränderungen sind direkt verwertbar, da der Hämatokrit und damit das Verhältnis der Blutbestandteile in der Zeit des 150 Min. dauernden Versuches nur geringfügig abfällt. Der Serotoningehalt der Thrombozyten fällt innerhalb von 20 Min. auf die Hälfte, um für kurze Zeit wieder geringfügig anzusteigen. Dabei steigt der Anteil des freien 5-HT im Plasma in gleichem Maße an. Nach 150 Min. ist wieder ein Wert unter 50 % des Ausgangswertes erreicht.

Auffallend ist der nach 20 Min. beginnende Wiederanstieg des Harmalinspiegels im Plasma. Die Addition der Absolutwerte des 5-HT im Plasma und in den Plättchen ergibt nach 90 bzw. 120 Min. eine höhere Summe als zu Versuchsbeginn.

F) Diskussion

I. Zur Bindung des 5-HT in Thrombozyten.

Die Freisetzung von 5-HT durch Harmalin aus Thrombozyten hängt nach den vorgelegten Ergebnissen von der Harmalinkonzentration, vom p_H der Inkubationsflüssigkeit und deren Temperatur ab. Der Sauerstoffpartialdruck hat keinen Einfluß. Im Plasma vorhandenes 5-HT wird entgegen einem Konzentrationsgefälle aktiv gespeichert. Dieser Vorgang kann durch Harmalin gehemmt werden. Bei einer 2×10^{-5} molaren Konzentration tritt eine annähernd 50 %ige Freisetzung auf. Eine 10^{-5} molare Harmalinlösung verursacht eine 50 %ige Aufnahmehemmung für 5-HT. Diese Ergebnisse sprechen für eine lockere Bindung des 5-HT in den Thrombozyten. Als mögliche Bindungspartner für 5-HT sind saure Polysaccharide, Proteine, Lipide, Pyridinnucleotide, Metalle, Taurin, Pyridoxalphosphat und ATP (78) ausgiebig diskutiert worden.

BAKER und Mitarbeiter konnten zwar nachweisen, daß der Gehalt an 5-HT und ATP in verschiedenen Geweben einem konstanten Verhältnis entspricht (206) und bei Freisetzung von Aminen ist ein gleichzeitiger ATP-Verlust festzustellen (207), doch gibt es Liberatoren wie Reserpin (208) und Nikotin (78), die keinen gleichzeitigen ATP-Abfall in den Thrombozyten bewirken. Diese Tatsache würde ATP als Bindungspartner ausschließen. Der Beweis scheint aber nicht zwingend, wenn man die nach Angaben von PLETSCHER und BARTHOLINI mögliche Speicherung von 5-HT in 2 verschiedenen Pools in Betracht zieht (156). Zumindest könnte 5-HT dort an ATP gebunden sein, wo Reserpin und Nikotin nicht angreifen. Auch BRODIE und Mitarb. räumen die Möglichkeit einer zweiten Bindungsart ein (209). In einem zweiten Speicherungsort spielen möglicherweise Lipide bei der Bindung des 5-HT eine Rolle.

Die Voraussetzung für die eventuelle Bindung von 5-HT an Lipide wäre durch folgende Befunde gegeben:

1. Das Vorkommen von Lipoiden in Thrombozyten ist nachgewiesen (210-212).
2. Es ist erwiesen, daß Lipide verschiedene Amine zu binden vermögen; z. B. bildet Cerebrosidsulfat mit Noradrenalin, Histamin, Acetylcholin und 5-HT komplexe Verbindungen (213) und roher Lipoidextrakt aus Gehirn ist fähig, 5-HT zu binden (214).
3. Über die Art und Stabilität der Bindung ist bisher zwar nichts bekannt, doch scheint nach unseren Untersuchungen Harmalin, das ebenso wie Nikotin (215, 216) eine besondere Affinität zu lipoidreichem Gewebe besitzt, 5-HT von seinem Bindungspartner zu verdrängen.
4. Harmalin ist auch nach mehrmaligem Waschen der Thrombozyten mit

physiologischer Kochsalzlösung in denselben nachzuweisen.

II. Zum Mechanismus der Harmalinwirkung auf Thrombozyten.

Aus den genannten Punkten ergibt sich die Frage, wie Harmalin in das Innere der Thrombozyten eindringen und dort wirken kann. Das Problem erhält besondere Bedeutung durch die von mehreren Autoren angeführte Ansicht, daß die Art und der Gehalt der Lipide, besonders der Phosphatide der Erythrozyten membran, als Ursache für die selektive Permeabilitätscharakteristik der Blutkörperchen von verschiedenen Säugetieren zu betrachten sind (217, 218). Diese von TURNER sowie KÖGL und ihren Mitarbeitern geäußerte Annahme deutet darauf hin, daß der Angriffspunkt für Harmalin die Membran der Thrombozyten oder der Granula ist. Damit läge der gleiche Wirkungsmechanismus wie für Nikotin und Lobelin bei der Freisetzung und Aufnahmehemmung von 5-HT und Histamin vor, wie er von SCHIEVELBEIN (174) beschrieben wurde. Die durchgeführten Versuche mit Nialamid, das nach SHIMAMOTO eine membranabdichtende Wirkung besitzt (219), schließen diesen Zusammenhang jedoch aus.

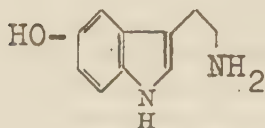
Als weitere Möglichkeit einer Reaktion mit Harmalin bleiben noch die beiden von PLETSCHER und BARTHOLINI postulierten 5-HT Pools, von denen der eine von MAO-haltigem Gewebe umgeben ist, andere dagegen nicht (156, 157). Diese Auffassung begründet sich auf der unterschiedlichen Beeinflussung des 5-HT-Metabolismus durch Liberatoren, die nicht zu den MAO-Hemmern zählen, wie Reserpin und Benzochinolinizinderivate. Da Harmalin gleichzeitig ein starker MAO-Hemmer ist, bietet sich ungeachtet dieser Differenzierung folgende Theorie an:

1. Die Thrombozyten-Membran ist für Harmalin und freies 5-HT durchlässig.
2. Harmalin verdrängt 5-HT von seinem Receptor.
3. Das nicht mehr gebundene 5-HT kann auf Grund des Konzentrationsgefälles nach außen gelangen.
4. Die Freisetzung ist reversibel.
5. Ein Abbau des freigesetzten 5-HT durch MAO kann infolge der Hemmung dieses Enzyms durch Harmalin nicht erfolgen.
6. Die wirksamere Form des Harmalins ist die nicht ionisierte freie Base und nicht die Salzform.

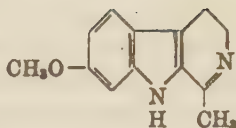
Für diese Theorie spricht:

Zu 1. Die nachgewiesene Empfindlichkeit der Thrombozytenmembran für p_{H} -Änderungen und die beschriebene Abhängigkeit der Freisetzung von 5-HT vom p_{H} -Wert (77).

2. Die Ähnlichkeiten in der Struktur:



5-HT



Harmalin

3. Ein Befund von SHIMAMOTO über Veränderungen der intimaschützenden intravasalen Schicht, der er eine "silicone like property" zuschreibt. Der genannte Silikon-Film wird von 5-HT, Adrenalin und Nikotin durchbrochen (219).
4. Beim in-vivo Versuch ist ein zeitweiliger Wiederanstieg des 5-HT-Spiegels in den Thrombozyten festzustellen (s. Abb. 13).
5. Bei Applikation von 5-HT-Liberatoren, die nicht gleichzeitig MAO-Hemmer sind, wie z. B. Reserpin, nimmt die Gesamtmenge des vorhandenen 5-HT im Gehirn und anderem Gewebe in vivo und in vitro ab (136, 152, 220-223); gleichzeitig lassen sich im Urin bzw. im Inkubationsmedium vermehrt die Metabolite 5-HIE und 5-Hydroxytryptophol nachweisen (137, 156, 157).
6. Bei steigendem p_H erhöht sich der als freie Base vorliegende Anteil des Harmalins.
- Die Aufnahme von 5-HT durch Thrombozyten erfolgt gegen ein starkes Konzentrationsgefälle. Bei einem Plasmaspiegel von $0,002 \mu\text{g/ml}$ ist noch Speicherung möglich (224), obwohl die Energiequelle für diesen Prozeß unbekannt ist, darf angenommen werden, daß Harmalin den energieliefernden Prozeß für die 5-HT-Aufnahme oder ein vermutetes Transportsystem nicht beeinflusst. Durch Blockierung der Rezeptoren kommt es zur Verschiebung des 5-HT-Gleichgewichts zugunsten des Plasmaspiegels. Dafür spricht die in vivo beobachtete zeitweilige relative Erhöhung des 5-HT in den Thrombozyten. Als Ursache wäre der erhöhte Serumspiegel an 5-HT denkbar (s. Abb. 13). Diese Erhöhung dürfte wegen der Freisetzung von 5-HT aus der Darmregion entweder durch Harmalin allein oder bzw. und auf Grund des Blutverlusts erfolgt sein. GORDON hatte nämlich festgestellt, daß eine Blutung über 10 ml/kg Körpergewicht bei Kaninchen und Ratten den 5-HT-Gehalt im Vollblut um über 50 % erhöht (225). Außerdem dürfte ebenso wie die Freisetzung auch die Speicherung reversibel sein, und zwar wegen folgender in vivo beobachteten Erscheinungen: 20 Minuten nach Versuchsbeginn hat der Harmalin-

spiegel ein Minimum erreicht und beginnt erneut anzusteigen. Die Ursache dafür mag in einer zeitweiligen intermediären Fixierung liegen. Sobald die Harmalin-Konzentration einen gewissen Wert erreicht, fällt auch der inzwischen leicht angestiegene 5-HT-Gehalt in Thrombozyten trotz weiter zunehmendem Serum-5-HT leicht ab.

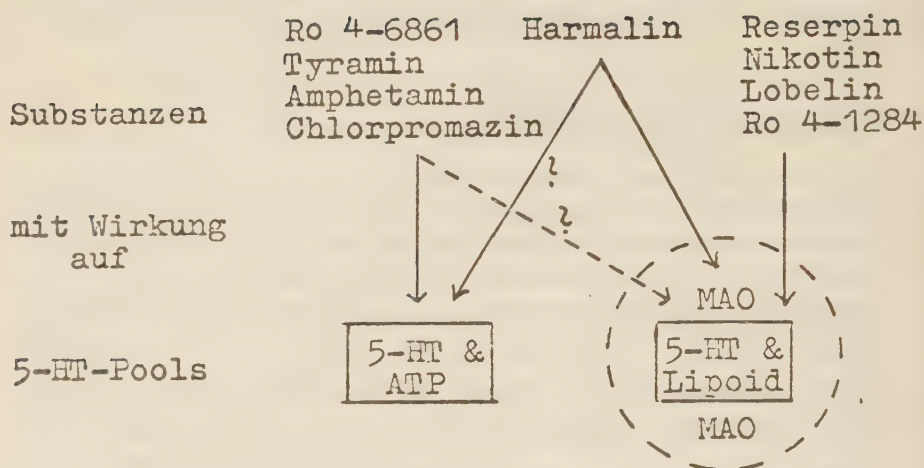
III. Harmalin und MAO-Hemmung.

Die Versuche, bei denen auf isolierte Thrombozyten zusammen mit Harmalin weitere MAO-Hemmer, wie Iproniazid, Nialamid einwirkten, sollten Aufschluß geben über die Rolle der MAO bei der 5-HT-Freisetzung. Die Zusammenhänge der vielfältigen Erscheinungen in diesem Bereich sind weitgehend unbekannt. Außerdem sollte eine mögliche Analogie im Wirkungsmechanismus aufgedeckt werden.

Nach den vorliegenden Ergebnissen dürfte MAO am Freisetzungsmechanismus von 5-HT aus Thrombozyten nicht beteiligt sein, und zwar aus folgenden Gründen:

1. Sauerstoff-Verbrauch ist bei der 5-HT-Freisetzung nicht festzustellen.
2. In vivo wirksame MAO-Hemmer haben wie Iproniazid und Nialamid keinen Einfluß auf die Freisetzung und Speicherungshemmung von 5-HT durch Harmalin.
3. Die zur 5-HT-Freisetzung notwendigen Harmalin-Konzentrationen sind um 2-3 Potenzen höher als für MAO-Hemmung erforderlich. So genügt z.B. nach LONG für eine 50 % Hemmung der MAO in der Meerschweinchenleber eine Molarität von 3×10^{-7} (226). Ein indirekter Einfluß der MAO-Hemmung durch Harmalin auf die 5-HT-Freisetzung aus Thrombozyten muß allerdings einge-
raumt werden. Von einer applizierten Harmalin-Menge blockiert ein kleinerer Anteil die Wirkung der MAO, die einen der beiden 5-HT-Speicher umgibt. Eine evtl. überschüssige Substanz verursacht die Freisetzung des 5-HT.

Hinweise auf die Frage, welcher der beiden angenommenen 5-HT-Pools mit MAO-haltigem Gewebe umgeben ist, ergeben sich aus den Befunden von PLETSCHER (156, 157) und SCHIEVELBEIN (78). Danach ist die Freisetzung durch Nikotin und Reserpin nicht mit einem ATP-Abfall in den Thrombozyten verbunden. Folglich müßten diese Pharmaka das evtl. lipoidgebundene 5-HT freisetzen. Bei der Freisetzung von 5-HT durch Reserpin ist aber das Auftreten von Metaboliten biogener Amine beobachtet worden. Deshalb dürfte dieser Pool mit MAO in Beziehung stehen. Die Verhältnisse beim Einwirken von Harmalin und anderer Substanzen soll entsprechend der gefundenen Ergebnisse das folgende Schema veranschaulichen:



Ob zwischen den beiden 5-HT-Pools Beziehungen bestehen, ist nicht bekannt. Ebenso ist unbekannt, ob ein gleichzeitiger Verlust an ATP bei der Freisetzung von 5-HT durch Harmalin auftritt. Darüber hinaus ergibt sich die Frage nach der Morphologie der 5-HT-Pools und des MAO-haltigen Gewebes.

IV. Zum Mechanismus der Harmalin-Wirkung auf das ZNS.

Inwieweit diese Verhältnisse auf die Vorgänge im Gehirn übertragbar sind, kann durch die ausgeführten Experimente nicht entschieden werden. Der auffallendste Unterschied zur Wirkung des Harmalins auf die Thrombozyten ist der, daß es im Gehirn nur als MAO-Hemmer in Erscheinung tritt (200). Es wäre möglich, daß die Blut-Liquorschranke nicht die zur Freisetzung notwendige Harmalinmenge passieren läßt; dagegen spricht jedoch die 1 Std. nach Injektion von 4 mg/kg Harmalin i. v. festgestellte Liquorkonzentration von $0,3 \mu\text{g/ml}$ ($=1,5 \times 10^{-6}$ molar) bei einem narkotisierten Hund.

Beim Zusammenwirken von 5-HT-Liberatoren mit MAO-Hemmern lassen sich alle Phänomene als Summationseffekte deuten, mit einer Ausnahme: der Antagonismus des Harmalins zu MAO-Hemmern vom Hydrazin-Typ ist nur verständlich, wenn man den vorgelegten Befunden entsprechend annimmt, daß Harmalin immer dann als Liberator fungiert, sobald ein anderer MAO-Hemmer auftritt. Am Thrombozytenmodell war ein solcher Antagonismus jedoch nicht zu beobachten. Deshalb kann man die geschilderten Vorstellungen vom Freisetzungs-

mechanismus sicher nicht in der angegebenen Form auf ähnliche Vorgänge im Gehirn übernehmen. Aus dem gleichen Grund dürfte die von PLETSCHER und Mitarb. geäußerte Vermutung zu bezweifeln sein, daß Harmalin den für Iproniazid zuständigen Receptor an der MAO blockiert. Wenn diese Annahme zutreffen würde, müßte dieser Effekt auch im Blut zu beobachten sein; es sei denn, die MAO des Gehirns unterscheidet sich von der des Blutes. Die Einheitlichkeit der MAO verschiedener Organherkunft ist tatsächlich nach PLETSCHER nicht völlig gesichert (132).

Somit können aus den bekannten Tatsachen über die Wirkung der MAO-Hemmer auf den Stoffwechsel der biogenen Amine nur Hypothesen über die Zusammenhänge der vielfältigen Erscheinungen gemacht werden. Deshalb neigen verschiedene Autoren zu einer Einschränkung der Bedeutung der biogenen Amine. So nimmt BERNHEIMER an, daß NA und 5-HT für das Zustandekommen der Parkinson-Symptomatik keine Rolle spielen (227), mit folgender Begründung:

Unter der Therapie mit MAO-Hemmern steigen die bei diesem Krankheitsbild auf die Hälfte der Normalwerte erniedrigten Konzentrationen an 5-HT und NA im Gehirn wieder an (129). Trotzdem wird die Symptomatik nicht nennenswert verändert. Es scheint jedoch nicht die Möglichkeit ausgeschlossen, daß die Abnahme der biogenen Amine im Gehirn trotzdem Ursache oder Folge der geschilderten Erscheinungen ist, aber die applizierten MAO-Hemmer kein therapeutisch anwendbares Mittel darstellen, weil sie zwar Gehalt an 5-HT und NA wieder normalisieren, in der dazu notwendigen Dosis indessen verursachen Hydrazin- und Harmanderivate selbst Tremor und Motilitätsstörungen (228-230).

G) Zusammenfassung

Die Wirkung von Harmalin auf den Gehalt der Thrombozyten an 5-Hydroxytryptamin (5-HT, Serotonin) wurde untersucht. Es wurde geprüft, ob sich die festgestellte Freisetzung und Aufnahmehemmung von 5-HT durch Harmalin durch andere Monoaminoxidasehemmer und Nikotin beeinflussen läßt. Während die Hemmung der Aufnahme von 5-HT in Thrombozyten durch Harmalin bereits bekannt ist, wurde die Freisetzung in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben.

Im einzelnen wurden folgende Befunde erhoben:

1. Harmalin setzt 5-HT aus plättchenreichem Plasma und aus in isotonischem Phosphatpuffer suspendierten Thrombozyten frei.
2. Die Freisetzung aus Thrombozyten in vitro ist abhängig von der Harmalin-Konzentration, vom p_H -Wert und der Temperatur der Inkubationsflüssigkeit.
3. Die Abwesenheit von Sauerstoff (bei Inkubation in N_2 -Atmosphäre) hat keinen Einfluß auf die Freisetzung. Die Freisetzung von 5-HT aus Thrombozyten durch Harmalin ist demnach ein sauerstoffunabhängiger Prozess.
4. Thrombozyten nehmen unter bestimmten Bedingungen 5-HT aus der umgebenden Flüssigkeit auf. Durch Harmalin wird dieser Prozess gehemmt.
5. Die 5-HT-freisetzende Wirkung des Harmalins auf Kaninchen-Thrombozyten kann auch in vivo demonstriert werden.
6. Die Freisetzung von 5-HT aus Thrombozyten durch Harmalin ist reversibel.
7. Die Monoaminoxidasehemmer Nialamid und Iproniazid (Marsilid) beeinflussen die Freisetzung von 5-HT aus Thrombozyten durch Harmalin nicht.
8. Bei der Freisetzung von 5-HT durch Harmalin wird Harmalin in die Thrombozyten aufgenommen.
9. Der Freisetzungsmechanismus wird als Verdrängungsprozess des 5-HT von seinem Receptor im Thrombozyten durch Harmalin gedeutet.
10. Die Bedeutung der Ergebnisse wird in Bezug auf mögliche Bindungspartner für 5-HT und die Wirkung des Harmalins auf das ZNS diskutiert.

H) Literaturverzeichnis

- (1) S. UDENFRIEND, H. WEISSBACH und C. T. CLARK:
J. biol. Chem. 215, 337 (1955)
- (2) S. UDENFRIEND, H. WEISSBACH und B. B. BRODIE in:
Methods of Biochemical Analysis Vol. VI, S. 95, New York und London 1958
- (3) C. MITOMA, H. WEISSBACH und S. UDENFRIEND:
Arch. Biochem. 63, 122 (1956)
- (4) S. UDENFRIEND, E. TITUS, H. WEISSBACH und R. E. PETERSON:
J. biol. Chem. 219, 335 (1956)
- (5) C. E. DALGLIESH und R. W. DUTTON:
Biochem. J. 65, 21 P (1957)
- (6) C. E. DALGLIESH und R. W. DUTTON:
Brit. J. Cancer 11, 296 (1957)
- (7) J. DAVIDSON, A. SJOERDSMA, L. N. LOOMIS und S. UDENFRIEND:
J. clin. Invest. 36, 1594 (1957); Clin. Research Proc. 4, 304 (1957)
- (8) S. UDENFRIEND, H. WEISSBACH und D. F. BOGDANSKI:
J. biol. Chem. 224, 803 (1957)
- (9) A. SJOERDSMA, H. WEISSBACH und S. UDENFRIEND:
Amer. J. Med. 20, 520 (1956); 23, 5 (1957)
- (10) A. N. SMITH, L. M. NYHUS, E. E. DALGLIESH; R. W. DUTTON, B. LENNOX
und P. S. MACFARLANE: Scot. Med. J. 2, 24 (1957)
- (11) R. S. STACEY und T. J. SULLIVAN:
J. Physiol. 137, 63 (1957)
- (12) O. EBER und F. LEMBECK:
Pflügers Arch. 265, 563 (1958)
- (13) K. FRETER, M. WEISSBACH, B. REDFIELD, S. UDENFRIEND und B. WITKOP:
J. Amer. chem. Soc. 80, 983 (1958)
- (14) M. SANDLER und P. J. D. SNOW:
Lancet i, 137 (1958)
- (15) G. ZBINDEN, A. PLETSCHER und A. STUDER:
Z. ges. exp. Med. 129, 615 (1958)

- (16) R. DONALDSON, S. J. GRAY und V. G. LETSOU:
Lancet ii, 1002 (1959)
- (17) B. KABAKOW, I. B. WEINSTEIN, G. ROSS und M. TRESSER:
Amer. J. Med. 26, 634 (1959)
- (18) R. SCHINDLER:
Biochem. Pharmacol. 1, 323 (1959)
- (19) V. MONESI:
Atti Soc. ital. Anat. 68, 393 (1960)
- (20) F. SULSER und B. B. BRODIE:
Science 131, 1440 (1960)
- (21) J. R. COOPER und I. MELCER:
J. Pharmacol. 132, 265 (1961)
- (22) S. UDENFRIEND, C. W. CLARK und E. TITUS:
J. Amer. chem. Soc. 75, 501 (1953)
- (23) J. M. BEILER und G. J. MARTIN:
J. biol. Chem. 211, 39 (1954)
- (24) C. T. CLARK, H. WEISSBACH und S. UDENFRIEND:
J. biol. Chem. 210, 139 (1954)
- (25) S. UDENFRIEND, E. TITUS und H. WEISSBACH:
J. biol. Chem. 216, 499 (1955)
- (26) N. J. GIARMAN:
Fed. Proc. 15, 428 (1956)
- (27) J. BUXTON und H. M. SINCLAIR:
Biochem. J. 62, 27 P (1956)
- (28) J. H. GADDUM und N. J. GIARMAN:
Brit. J. Pharmacol. 11, 88 (1956)
- (29) J. A. BUZARD und P. D. NYTCH:
J. biol. Chem. 227, 225 (1957)
- (30) K. FRETER, H. WEISSBACH, S. UDENFRIEND und B. WITKOP:
Proc. Soc. exp. Biol., N. Y. 94, 725 (1957)
- (31) E. A. ZELLER, I. BERNSOHN, W. M. INSKIP und J. W. LAUER:
Naturwissenschaften 44, 427 (1957)

- (32) A. N. DAVISON und M. SANDLER:
Nature Lond. 181, 186 (1958)
- (33) H. DENGLER und G. REICHEL:
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp-Path. Pharmacol. 234, 275 (1958)
- (34) H. LANGEMANN:
5-Hydroxytryptamine (Pergamon Press, London, 1958) S. 153
- (35) E. WESTERMANN, H. BALZER und J. KNELL:
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 234, 194 (1958)
- (36) P. HAGEN und F. L. LEE:
J. Physiol. 143, 7 P (1958)
- (37) D. PALM:
Arch. exp. Path. Pharmacol. 234, 206 (1958)
- (38) G. B. WEST:
J. Pharm., Lond., Suppl. 10, 92 T (1958)
- (39) A. BERTLER und D. ROSENGREN:
Experientia 15, 382 (1959)
- (40) P. HOLTZ:
Pharmacol. Rev. 11, 317 (1957)
- (41) E. WERLE und D. AURES:
Hoppe-Seyler's 316, 45 (1959)
- (42) A. YUWILER, E. GELLER und S. EIDUSON:
Arch. Biochem. 80, 162 (1959)
- (43) E. ROSENGREN:
Acta physiol. scand. 49, 364 (1960)
- (44) D. D. SMITH und A. A. MILES:
Brit. J. exp. Path. 41, 305 (1960)
- (45) A. YUWILER, E. GELLER und S. EIDUSON:
Arch. Biochem. Biophys. 89, 143 (1960)
- (46) V. ERSPAMER, A. GLAESSER, M. B. NOBILI und C. PASINI:
Experientia 16, 505 (1960)
- (47) P. HAGEN, N. WEINER, S. ONO und F. L. LEE:
J. Pharmacol. 130, 9 (1960)

- (48) A. BERTLER, A. -M. ROSENGREN und E. ROSENGREN:
Experienta 14, 418 (1960)
- (49) UDENFRIEND, W. M. LOVENBERG und H. WEISSBACH:
Fed. Proc. 19, 7 (1960)
- (50) R. KUNTZMANN, P. A. SHORE, D. BOGDANSKI und B. B. BRODIE:
J. Neurochem. 6, 226 (1961)
- (51) V. ERSPAMER, A. GLAESSER, C. PASINI, G. STOPPANI:
Nature 189, 483 (1961)
- (52) E. WERLE und G. MENNICKEN:
Biochem. Z. 296, 99 (1938)
- (53) H. BLASCHKO:
Biochem. J. 52, X (1952)
- (54) H. BLASCHKO:
Pharmakol. Rev. 4, 415 (1952)
- (55) W. A. FREYBURGER, B. E. GRAHAM, M. M. RAPPORT, P. H. SEAY, W. M. GOVIER,
O. F. SWOAP und M. J. VAN DER BROOK:
Pharmacol. exp. Ther. 105, 80 (1952)
- (56) W. M. GOVIER, B. G. HOWES und A. J. GIBBONS:
Science 118, 596 (1953)
- (57) E. TITUS und S. UDENFRIEND:
Fed. Proc. 13, 411 (1954)
- (58) A. SJOERDSMA, T. E. SMITH, T. D. STEVENSON und S. UDENFRIEND:
Proc. Soc. exp. Biol., N. Y. 89, 36 (1955)
- (59) V. ERSPAMER:
J. Physiol., Lond. 127, 118 (1955)
- (60) H. WEISSBACH, B. G. REDFIELD und S. UDENFRIEND:
J. biol. Chem. 229, 953 (1957)
- (61) K. NAKAI:
Nature, Lond., 181, 1734 (1958)
- (62) J. DE CORRAL-SALETA:
20th Intern. Congress Bruxelles, 1956. Abstr. Comm. pp. 225-226
- (63) V. ERSPAMER:
J. Physiol. 133, 1 (1956)

- (64) V. FERRARI, E. GINOULHIAC und L. T. TENCONI:
Boll. Soc. ital. Biol. sper. 33, 1418 (1957)
- (65) C. AINSWORTH:
J. Amer. chem. Soc. 79, 5245 (1957)
- (66) M. ARMSTRONG, K. N. F. SHAW, M. J. GORTATOWSKI und H. SINGER:
J. biol. Chem. 232, 17 (1958)
- (67) CH. E. LEWIS:
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 99, 523 (1958)
- (68) V. ERSPAMER und A. TESTINI:
J. Pharm. Pharmacol. 11, 618 (1959)
- (69) W. M. Mc ISAAC und I. H. PAGE:
J. biol. Chem. 234, 858 (1959)
- (70) P. A. BIANCHI, P. F. CROSTI und P. E. LUCCHELLI:
Progresso med. 16, 174 (1960)
- (71) B. T. CHADWICK und J. H. WILKINSON:
Biochem. J. 68, 1 P, (1958); 76, 102 (1960)
- (72) M. SANDLER und R. G. SPECTOR:
Nature 169, 838 (1961)
- (73) H. WEISSBACH, W. LOVENBERG, B. G. REDFIELD und S. UDENFRIEND:
J. Pharmacol. 131, 26 (1961)
- (74) E. WERLE und G. MENNIKEN:
Biochem. Z. 291, 325 (1957)
- (75) L. C. CLARK, R. PH. FOX, R. MORIN und F. BENINGTON:
J. nerv. ment. Dis. 124, 466 (1956)
- (76) V. ERSPAMER:
Fortschr. Arzneimittelf. 3, 151 (1961)
- (77) H. SCHIEVELBEIN:
Habilitationsschrift der Med. Fak. der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München (1964)
- (78) H. SCHIEVELBEIN:
Acta haemat. 33, 110 (1965)
- (79) H. SCHIEVELBEIN:
Arch. int. Pharmacodyn 155/2, 311 (1965)

- (80) S. UDENFRIEND, C. R. CREVELING, M. OZAKI, J. M. DALY und B. WITKOP:
Arch. Biochem. 84, 249 (1959)
- (81) S. UDENFRIEND, C. R. CREVELING, H. POSNER, B. G. REDFIELD, J. DALY und
B. WITKOP:
Arch. Biochem. 83, 501 (1959)
- (82) P. J. D. SNOW, J. E. LENHARD-JONES, G. CURZON und R. S. STACEY:
Lancet ii, 1004 (1955)
- (83) A. SJOERDSMA und S. UDENFRIEND:
J. clin. Invest. 34, 914 (1955)
- (84) H. LANGEMANN und J. KAGI:
Klin. Wschr. 34, 237 (1956)
- (85) V. ERSPAMER:
Pharmacol. Rev. 6, 425 (1954)
- (86) A. PLETSCHER:
Experienta 12, 479 (1956)
- (87) J. AXELROD, H. WEIL-MALHERBE und R. TOMCHICK:
Fed. Proc. 18, 364 (1959)
- (88) W. RAAB und W. GIGEE:
Proc. Soc. exp. Biol. N. Y., 76, 97 (1951)
- (89) D. RICHTER und P. C. MCINTOSH:
Amer. J. Physiol. 135, 1 (1941)
- (90) A. B. ROTHBALLER:
Pharmacol. Rev. 11, 494 (1959)
- (91) P. A. SHORE, A. PLETSCHER, EG. TOMICH, A. CARLSSON, R. KUNTZMAN und
B. B. BRODIE:
Ann. Acad. Sci. 66, 609 (1957)
- (92) S. UDENFRIEND und A. WEISSBACH:
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 97, 748 (1958)
- (93) R. M. HARDISTY und H. H. WOLFF:
Brit. J. Haematol. 1, 309 (1955)
- (94) R. M. HARDISTY und R. S. STACEY:
Brit. J. Haematol. 3, 292 (1957)
- (95) E. GRASSO, P. BIANCHI, P. F. CROSTI und E. ERMACORA:
Min. pediatri., 12, 411 (1960)

- (96) H.E. HUTCHISON, J.M. STARK und J.A. CHAPMAN:
J. clin. Path. 12, 265 (1959)
- (97) E. SCHMID, F. SCHEIFFARTH, L. ZICHA und E. SIEDE:
Z. ges. exp. Med. 133, 1 (1960)
- (98) H. SCHIEVELBEIN:
Arzneimittelforschung 13, 916 (1963)
- (99) S. UDENFRIEND:
4. Internat. Kongress Biochem. Wien 1958, Symp. III
- (100) V. BALDRIGHI und V. FERRARI:
Folia cardiologica 14, 7 (1955)
- (101) G. ANNONI, M. LEONE, A. LONGARETTI, G. LONGO und P.D. LUCCHELLI:
Clin. terapeutica 8, 125 (1955)
- (102) R.F. GROVER, S.K. OLSON und S.G. BLOUNT:
J. Clinical Research 6, 62 (1958)
- (103) D.H. LEMESSURIER, C.J. SCHWARTZ und R.F. WHELAN:
Brit. J. Pharmacol. 14, 246 (1959)
- (104) G. REID:
J. Physiol. 118, 435 (1952)
- (105) G.M. MAXWELL, C.A. CASTILLO, D.H. WHITE Jr. und C.W. CRUMPTON:
Clin. Research, Proc. 4, 294 (1957)
- (106) G.M. MAXWELL, C.A. CASTILLO, J.E. CLIFFORD, C.W. CRUMPTON und G.G. ROWE:
Amer. J. Physiol. 197, 736 (1959)
- (107) J.G. NOBLE und E.M. NANSON:
Ann. Surg. 150, 846 (1959)
- (108) C.W. CRUMPTON, C.A. CASTILLO, G.C. ROWE und G.M. MAXWELL:
Ann. New York Acad. Sci. 80 (3), 960 (1959)
- (109) B.J. HAVERBACK, F.T. DUTSCHER, P.A. SHORE, E.G. TOMICH, L.L. TERRY und B.B. BRODIE:
New England J. Med. 256, 343 (1957)
- (110) P. ZAMBONI:
Arch. int. Pharmacodyn. 113, 203 (1957)
- (111) G. CALI und G. LOMEIO:
Rassegna Fisiopat. clin. ter. 27, 1093 (1956)

- (112) G. C. FUGA:
Dermatologia 10, 80 (1959)
- (113) B. J. HAVERBACK, C. H. M. HOGBEN, N. C. MORAN und L. L. TERRY:
Gastroenterology 32, 1058 (1957)
- (114) F. LEMBECK:
Pflügers Arch. ges. Physiol. 265, 567 (1958)
- (115) G. ZBINDEN:
Ergebn. allg. Path. u. Path. Anat. 39, 226 (1960)
- (116) E. SCHMID, I. SENG, N. HENNING und K. HEINKEL:
Gastroenterologia 93, 235 (1960)
- (117) G. BERTACCINI und S. CHIEPPA:
Lancet i, 881 (1960)
- (118) J. C. ROSENBERG, R. DAVIS; W. H. MORAN und B. ZIMMERMANN:
Fed. Proc. 18, 503 (1959)
- (119) M. RATZENHOFER:
Krebsarzt 11, 257 (1956)
- (120) A. C. RITCHIE:
Amer. J. med. Sci. 232, 311 (1956)
- (121) CH. HEDINGER:
Helv. medica Acta 25, 351 (1958)
- (122) P. J. D. SNOW in:
Modern Trends in Endocrinology, London 1958, S. 263
- (123) A. H. THORSON:
Acta med. scand. 161, Suppl. 334, 1 (1958)
- (124) J. WALDENSTRÖM und E. LJUNGBERG:
Acta med. scand. 152, 293, 311 (1955)
- (125) D. M. SPAIN:
Advance int. Med. 9, 207 (1958)
- (126) E. E. POLLI, P. A. BIANCHI und P. F. CROSTI:
Haematol. latina 1, 250 (1958)
- (127) E. SCHMID, F. SCHEIFFARTH und L. ZICHA:
Lancet ii, 354 (1959)

- (128) C. M. P. PARE, M. SANDLER und R. S. STACEY:
Lancet i, 551 (1957)
- (129) W. BIRKMEYER und E. NEUMEYER:
Nervenarzt 34, 373 (1963)
- (130) K. GRABNER und F. LEMBECK:
Arch. exp. Path. Pharm. 240, 157 (1960)
- (131) A. AKCASU, M. AKCASU und S. B. TUMAY:
Nature 187, 324 (1960)
- (132) A. PLETSCHER, K. F. GEY und P. ZELLER:
Fortschr. der Arzneimittelf. 2, 417 (1960)
- (133) D. RICHTER, M. H. LEE und D. HILL:
Biochem. J. 35, 1225 (1941)
- (134) B. B. BRODIE:
5-Hydroxytryptamine (Pergamon Press, London 1958) S. 64
- (135) P. A. SHORE:
Pharmacol. Rev. 14, 531 (1962)
- (136) A. PLETSCHER, P. A. SHORE und B. B. BRODIE:
Science 122, 374 (1955)
- (137) P. A. SHORE, S. L. SILVER und B. B. BRODIE:
Science 122, 284 (1955)
- (138) P. A. SHORE, A. PLETSCHER und B. B. BRODIE:
J. Pharmacol. 116, 51 (1956)
- (139) E. P. BENDITT und R. L. WONG:
J. exp. med. 105, 509 (1957)
- (140) T. P. WAALKES, H. COBURN und L. L. TERRY:
J. Allergy 30, 408 (1959)
- (141) L. C. LEEPER, H. WEISSBACH und S. UDENFRIEND:
Arch. Biochem. 77, 417 (1958)
- (142) L. C. LEEPER, H. WEISSBACH und S. UDENFRIEND:
J. Pharmacol. exp. Ther. 122, 42 A (1958)
- (143) A. J. VALCOURT:
Fed. Proc. 16, 130 (1957)

- (144) A. J. VALCOURT:
Arch. Neurol. Psychiatr. 81, 292 (1959)
- (145) H. F. FRASER, A. J. EISENMAN und J. W. BROOKS:
Fed. Proc. 16, 298 (1957)
- (146) H. TODRICK, M. DICK und A. C. TAIT:
Brit. Med. J. i, 496 (1958)
- (147) V. ERSPAMER und C. CICERI:
Experientia 13, 87 (1957)
- (148) V. ERSPAMER:
Experientia 12, 63 (1956)
- (149) P. FISCHER und J. LECOMTE:
C. r. Soc. Biol. Paris, 150, 1026 (1956)
- (150) G. ZBINDEN, A. PLETSCHER und A. STUDER:
Klin. Wschr. 35, 565 (1957)
- (151) G. ZBINDEN und A. STUDER:
Experientia 14, 201 (1958)
- (152) A. CARLSSON, E. ROSENGREN, A. BERTLER und J. NILSSON in S. GARATTINI
und V. GHETTI:
Psychotropic Drugs Amsterdam 1957 S. 363
- (153) F. B. HUGHES, P. A. SHORE und B. B. BRODIE:
Experientia 14, 201 (1958)
- (154) A. CARLSSON, P. A. SHORE und B. B. BRODIE:
J. Pharmacol 120, 334 (1957)
- (155) D. E. SCHWARTZ, A. PLETSCHER, K. F. GEY und J. RIEDER:
Helv. physiol. Acta 18, 10 (1960)
- (156) G. BARTHOLINI und A. PLETSCHER:
Experientia 20, 376 (1964)
- (157) A. PLETSCHER und G. BARTHOLINI:
Helv. physiol. Acta 22, 684 (1964)
- (158) A. PLETSCHER und K. F. GEY:
Helv. physiol. pharmacol. Acta 17, C35 (1959)
- (159) J. N. LANGLEY und W. L. DICKINSON:
Proc. R. Soc. London 46, 423 (1889)

- (160) G. MANSFELD:
Orv. hetilap. 52, 241 (1908)
- (161) P. S. LARSON, H. B. HAAG und H. SILVEITE:
Tobacco, Exp. and Clin. Studies, S. 354, Baltimore 1961
- (162) M. VOGT:
J. Physiol. 123, 451 (1954)
- (163) E. A. ZELLER und J. BARSKY:
Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. 81, 459 (1952)
- (164) E. A. ZELLER, J. BARSKY, E. R. BERMAN und J. R. FOUTS:
J. Lab. clin. Med. 40, 965 (1952)
- (165) E. A. ZELLER, J. BARSKY, J. R. FOUTS, W. F. KIRCHHEIMER und L. S. VAN
ORDEN:
Experientia Basel, 8, 349 (1952)
- (166) A. HORITA:
J. Pharmacol. exp. Ther. 122, 176 (1958)
- (167) A. N. DAVISON:
Bull. Soc. Chim. biol. 40, 1737 (1958)
- (168) S. GURIN und A. M. DELLUVA:
J. biol. Chem. 170, 545 (1947)
- (169) P. J. G. MANN und J. H. QUASTEL:
Biochem. J. 34, 414 (1940)
- (170) G. ORZECOWSKI:
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. 198, 27 (1941)
- (171) A. SJOERDSMA, L. A. GILLESPIE und S. UDENFRIEND:
Ann. N. Y. Acad. Sci. 80, 969 (1959)
- (172) B. G. BROWN und P. HEY:
Brit. J. Pharmacol. 11, 58 (1956)
- (173) H. SCHIEVELBEIN und E. WERLE:
Psychopharmacologia 3, 35 (1962)
- (174) H. SCHIEVELBEIN und B. ZITZELSBERGER:
Med. exp. 11, 247 (1964)
- (175) A. PLETSCHER und K. F. GEY:
Psychiat. Neurol. 140, 165 (1960)

- (176) S. UDENFRIEND, B. WITKOP, B. G. REDFIELD und H. WEISSBACH:
Biochem. Pharmacol. 1, 160 (1958)
- (177) R. F. LONG und A. W. LESSIN:
Biochem. J. 82, 4 P (1962)
- (178) T. SOLLMANN in:
A Manual of Pharmacology, Philadelphia und London 1957
- (179) J. A. GUNN:
Handbuch d. exp. Pharmacol., Springer Verlag, Berlin 1937
- (180) K. BERINGER:
Nervenarzt 1, 265 (1928)
- (181) B. J. HAVERBACK, P. A. SHORE, B. B. BRODIE:
New Engl. J. Med. 21, 219 (1957)
- (182) J. A. GUNN:
Arch. int. Pharmacodyn. 50, 379 (1935)
- (183) A. MARINESCO, A. KREINDLER und A. SCHEIM:
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 154, 301 (1930)
- (184) P. NARANJO:
Rev. Confed. med.-panamer. 6, 1 (1959)
- (185) F. FLURY:
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 64, 105 (1911)
- (186) G. ZETLER:
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 231, 34 (1957)
- (187) C. BRAMWELL, M. CAMPBELL und W. EVANS:
Lancet ii, 39 (1933)
- (188) A. FISCHER; M
Münch. med. Wschr. 1919/I, 451
- (189) L. LEWIN und P. SCHUSTER:
Dtsch. med. Wschr. 1929, 419
- (190) A. PLETSCHER, H. BESENDORF, H. P. BÄCHTOLD und K. F. GEY:
Helv. physiol. Acta 17, 202 (1959)
- (191) B. B. BRODIE, A. PLETSCHER und P. A. SHORE:
Science 122, 968 (1955)

- (192) B. B. BRODIE, S. SPECTOR, R. KUNTZMAN und P. A. SHORE:
Naturwissenschaften 45, 243 (1958)
- (193) A. PLETSCHER:
Schweiz. med. Wschr. 87, 1532 (1957)
- (194) P. A. SHORE, L. GILLESPIE, S. SPECTOR und D. PROCKOP:
Naturwissenschaften 45, 340 (1958)
- (195) B. B. BRODIE, A. PLETSCHER und P. A. SHORE:
J. Pharmacol. 116, 9 (1956)
- (196) A. PLETSCHER:
Helv. physiol. Acta 14, C 76 (1956)
- (197) A. PLETSCHER, H. BESENDORF und H. P. BAECHTOLD:
Arch. exp. Path. Pharmacol 232, 499 (1958)
- (198) A. L. BARTLET:
Brit. J. Pharmacol. 15, 140 (1960)
- (199) S. SPECTOR, R. KUNTZMAN, P. A. SHORE und B. B. BRODIE:
J. Pharmacol. 130, 256 (1960)
- (200) A. PLETSCHER und H. BESENDORF:
Experientia XV, 1, 25 (1959)
- (201) A. HORITA und C. CHINN:
Biochem. Pharmacol. 13, 371 (1964)
- (202) S. WITTE in N. HENNING:
Klinische Laboratoriumsdiagnostik, Verlag Urban und Schwarzenberg
1959, S. 171
- (203) K. MACEK und S. VANECEK:
Collection Czechoslov. Chem. Commun. 26, 2705 (1961); Ref.: Chromato-
graphic Data 9, D1 (1962)
- (204) E. STAHL:
Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag 1962, S. 503
- (205) R. P. HAYCOCK, P. B. SHETH und W. J. MADER:
J. Am. Pharm. Assoc. 48, 479 (1959)
- (206) R. BAKER, H. BLASCHKO und G. V. R. BORN:
Physiol. 149, 55 (1959)
- (207) N. A. HILLARP:
Nature 187, 1032 (1960)

- (208) G. V. R. BORN, G. I. C. INGRAM und R. S. STACEY:
Brit. J. Pharmacol. 13, 62 (1958)
- (209) B. B. BRODIE, E. G. TOMICH, R. KUNTZMAN und P. A. SHORE:
J. Pharmacol. 119, 461 (1957)
- (210) A. J. MARCUS, H. L. ULLMAN und M. WOLFMAN:
J. Lipid Res. 1, 179 (1960)
- (211) P. A. MARKS, A. CELLHORN und C. KIDSON:
J. biol. Chem. 235, 2579 (1960)
- (212) C. M. GROSSMAN, A. M. MacEWAN und I. DILLEY:
Nature 188, 950 (1960)
- (213) J. P. GREEN, J. D. ROBINSON und M. DAY:
J. Pharmacol. exp. Therap. 131, 12 (1961)
- (214) D. W. WOOLLEY:
Proc. Nat. Acad. Sci. US. 44, 1202 (1958)
- (215) E. WERLE und A. MEYER:
Biochem. Z. 321, 221 (1950)
- (216) X. G. SCHMITERLÖW und C. HANSSON:
Nature 194, 298 (1962)
- (217) W. C. TURNER, H. M. ANDERSON und C. P. GANDAL:
Biochem. Biophys. Acta 30, 130 (1958)
- (218) F. KÖGL, J. DE GIER, I. MULDER und L. L. M. VAN DEENEN:
Biochem. Biophys. Acta 43, 95 (1960)
- (219) T. SHIMAMOTO:
Asian Med. J. 3, 379 (1960)
- (220) A. PLETSCHER, P. A. SHORE und B. B. BRODIE:
J. Pharmacol. 116, 84 (1956)
- (221) B. B. BRODIE, P. A. SHORE und A. PLETSCHER:
Science 123, 992 (1956)
- (222) B. B. BRODIE, J. S. OLIN, R. G. KUNTZMAN und P. A. SHORE:
Science 125, 1293 (1957)
- (223) A. CARLSSON, M. LINDQUIST, T. MAGNUSSON und B. WALDECK:
Science 127, 471 (1958)

- (224) G. V. R. BORN und R. E. GILLSON:
J. Physiol. 137, 82 P (1957); 146, 472 (1959)
- (225) P. GORDON:
Feder. Proc. 20, 315 (1961)
- (226) R. F. LONG:
Biochem. J. 82, 3 P (1962)
- (227) H. BERNHEIMER, W. BIRKMEYER und O. HOENYKIEWICZ:
Klin. Wschr. 41, 465 (1963)
- (228) B. B. BRODIE, S. SPECTOR und P. A. SHORE:
Ann. N. Y. Acad. Sci. 80, 609 (1959)
- (229) G. M. EVERETT, J. C. DAVIN und J. E. P. TOMAN:
Fed. Proc. 18, 388 (1959)
- (230) S. IRWIN:
Fed. Proc. 18, 406 (1959)

Herrn Professor Dr. Dr. E. WERLE danke ich für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes.

Den Herren Privatdozenten Dr. H. SCHIEVELBEIN und Dr. I. TRAUTSCHOLD verdanke ich viele Anregungen und Ratschläge.

Fräulein I. ECKERT möchte ich für die Mithilfe bei den Messungen danken.

Lebenslauf

Ich bin geboren am 6. Mai 1938 als Sohn des damaligen Polizeioberwachmannes Josef Peter und seiner Ehefrau Maria, geborene Ullmann in Chodau, Kreis Karlsbad.

Ich besuchte folgende Schulen:

September 1944 - Februar 1945 Volksschule Graslitz

Juni 1946 - Juli 1948 Volksschule Burglengenfeld

September 1948 - Juli 1957 Albrecht-Altdorfer-Gymnasium Regensburg.

Im Wintersemester 1957/58 immatrikulierte ich mich an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Fächer Mathematik und Physik. Seit Sommersemester 1960 studiere ich ebenda Medizin.

Ich bin verheiratet seit 1961 mit Renate Peter, geborene Zacher und habe einen Sohn im Alter von 4 Jahren.

Das medizinische Staatsexamen bestand ich am 16. Februar 1966.

